

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-313684

(43) 公開日 平成11年(1999)11月16日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

FI

C12N 15/09

ZNA

C12N 15/00

ZNAA

9/10

9/10

C12P 19/26

C12P 19/26

// (C12N 9/10

C12R 1:91)

審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願平10-177844

(22) 出願日 平成10年(1998)6月24日

(31) 優先権主張番号 特願平10-54007

(32) 優先日 平10(1998)3月5日

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(71) 出願人 000195524

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(71) 出願人 591038945

村松 喬

愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-161

(72) 発明者 内村 健治

愛知県名古屋市熱田区新尾頭一丁目5番1号

(72) 発明者 村松 秀城

静岡県榛原郡榛原町切山1406番地の2

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素のポリペプチド及びそれをコードするDN

(57) 【要約】 A

【課題】 N-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素のポリペプチド、及びこれをコードするDNAを提供する。

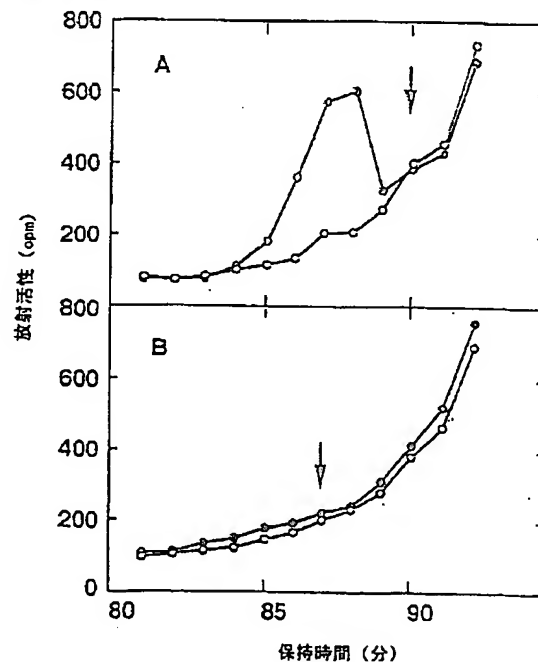
【解決手段】 以下の (a) 又は (b) のポリペプチド。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列 (a) において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc (式1)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta$ 1-3は $\beta$ 1-3グリコシド結合を、 $\beta$ 1-4は $\beta$ 1-4グリコシド結合をそれぞれ示す)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の（a）又は（b）のポリペプチド。

（a）配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

$\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ （式1）

（但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta 1-3$ は $\beta 1-3$ グリコシド結合を、 $\beta 1-4$ は $\beta 1-4$ グリコシド結合をそれぞれ示す）

【請求項2】 以下の（a）又は（b）のポリペプチド。

（a）配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

$\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ （式1）

（但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta 1-3$ は $\beta 1-3$ グリコシド結合を、 $\beta 1-4$ は $\beta 1-4$ グリコシド結合をそれぞれ示す）

【請求項3】 下記の性質を有するポリペプチド。

①作用：硫酸基供与体から、下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する。

$\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ （式1）

（但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta 1-3$ は $\beta 1-3$ グリコシド結合を、 $\beta 1-4$ は $\beta 1-4$ グリコシド結合をそれぞれ示す）

②基質特異性：コンドロイチン、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、脱硫酸化ケラタン硫酸、CDSNS-ヘパリン、ブタ胃由来ムチン、ウシ顎下腺由来ムチン及び下記式2で示されるオリゴ糖には硫酸基を転移しない。

$\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ （式2）

（但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta 1-3$ は $\beta 1-3$ グリコシド結合を、 $\beta 1-4$ は $\beta 1-4$ グリコシド結合をそれぞれ示す）

③N末端のアミノ酸配列

配列番号2におけるアミノ酸番号1～48で表されるアミノ酸配列からなる。

【請求項4】 以下の（a）又は（b）のポリペプチド

をコードするDNA。

（a）配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

$\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ （式1）

（但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta 1-3$ は $\beta 1-3$ グリコシド結合を、 $\beta 1-4$ は $\beta 1-4$ グリコシド結合をそれぞれ示す）

【請求項5】 配列番号1において塩基番号470～1918で表される塩基配列を含むDNA。

【請求項6】 以下の（a）又は（b）のポリペプチドをコードするDNA。

（a）配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

$\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ （式1）

（但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta 1-3$ は $\beta 1-3$ グリコシド結合を、 $\beta 1-4$ は $\beta 1-4$ グリコシド結合をそれぞれ示す）

【請求項7】 配列番号3において塩基番号390～1841で表される塩基配列を含むDNA。

【請求項8】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを、下記式3で示される糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、下記式4で示される硫酸化糖の製造方法。

$\text{GlcNAc}-\text{R}$ （式3）

（但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、-Rは水素原子又はグリコシド結合した糖残基をそれぞれ示す）

$(\text{SO}_3-6)\text{GlcNAc}-\text{R}$ （式4）

（但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、 $\text{SO}_3-6$ は6位の水酸基が硫酸化されていることを、-Rは水素原子又はグリコシド結合した糖残基をそれぞれ示す）

【請求項9】 請求項4～7のいずれか1項に記載のDNAを細胞に移入し、次いで該細胞を培養する工程を少なくとも含む、硫酸化糖の製造方法。

【請求項10】 請求項4～7のいずれか1項に記載のDNA及びフコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを共に細胞に移入する、請求項9記載の硫酸化糖

の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、N-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素（N-アセチルグルコサミン-6-O-スルホトランスフェラーゼ）のポリペプチド及びそれをコードする塩基配列を有するDNAに関するものである。

【0002】

【従来の技術】以下に本発明に最も近い技術について説明する。Biochem. J., 319, 209-216(1996)及びJ. Biol. Chem., 272, 29493-29501(1997)には、ラット及びヒトのミクロソーム画分中にN-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素活性が存在することが記載されている。しかし、N-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素のポリペプチドの単離及び物質同定についての報告はなく、またこのポリペプチドをコードするDNAについても知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】N-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素のポリペプチドが得られれば、L-セレクトイン(リンパ球のホーミングや炎症初期に起こる白血球のローリング等に関与している)のリガンドであるGlyCAM-1等の糖鎖の合成に用いることができる。またこのポリペプチドをコードするDNAは、当該ポリペプチドの大量生産への利用や、遺伝子移入による生体内(細胞)でのGlyCAM-1(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc-構造を有する)の人工的合成等への利用が期待される。

【0004】すなわち本発明は、N-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素のポリペプチド、及びこれをコードするDNAを提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta$ 1-3は $\beta$ 1-3グリコシド結合を、 $\beta$ 1-4は $\beta$ 1-4グリコシド結合をそれぞれ示す)の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に特異的に硫酸基を転移する活性を有する、N-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードするDNAのクローニングに成功した。また該DNAによりN-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素のポリペプチドが発現されることを確認し、該ポリペプチドを同定することに成功して本発明を完成させた。

【0006】すなわち本発明は、以下の(a)又は(b)のポリペプチド(以下「本発明ポリペプチド」ともいう)を提供する。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(式1)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta$ 1-3は $\beta$ 1-3グリコシド結合を、 $\beta$ 1-4は $\beta$ 1-4グリコシド結合をそれぞれ示す)

【0007】本発明ポリペプチドには、以下の(a)又は(b)のポリペプチドも包含される。

(a) 配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(式1)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta$ 1-3は $\beta$ 1-3グリコシド結合を、 $\beta$ 1-4は $\beta$ 1-4グリコシド結合をそれぞれ示す)

【0008】また本発明ポリペプチドには、下記の性質を有するポリペプチドも包含される。

①作用：硫酸基供与体から、下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する。

GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(式1)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta$ 1-3は $\beta$ 1-3グリコシド結合を、 $\beta$ 1-4は $\beta$ 1-4グリコシド結合をそれぞれ示す)

②基質特異性：コンドロイチン、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、脱硫酸化ケラタン硫酸、CDSNS-ヘパリン、ブタ胃由来ムチン、ウシ顎下腺由来ムチン及び下記式2で示されるオリゴ糖には硫酸基を転移しない。

Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(式2)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta$ 1-3は $\beta$ 1-3グリコシド結合を、 $\beta$ 1-4は $\beta$ 1-4グリコシド結合をそれぞれ示す)

③N末端のアミノ酸配列

配列番号2におけるアミノ酸番号1～48で表されるアミノ酸配列からなる。

【0009】また本発明は、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNA(以下「本発明DNA」ともいう)を提供する。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列 (a) において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (式1)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta$  1-3は $\beta$  1-3グリコシド結合を、 $\beta$  1-4は $\beta$  1-4グリコシド結合をそれぞれ示す)

【0010】また本発明DNAには、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNAも含まれる。

(a) 配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列 (a) において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (式1)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、Galはガラクトース残基を、 $\beta$  1-3は $\beta$  1-3グリコシド結合を、 $\beta$  1-4は $\beta$  1-4グリコシド結合をそれぞれ示す)

【0011】本発明DNAとしてより好ましいものとして、配列番号1において塩基番号470~1918で表される塩基配列を含むDNA、及び配列番号3において塩基番号390~1841で表される塩基配列を含むDNAが挙げられる。

【0012】また本発明には、上記に記載のポリペプチドを、下記式3で示される糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、下記式4で示される硫酸化糖の製造方法(以下「本発明製造方法1」ともいう)を提供する。

GlcNAc-R (式3)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、-Rは水素原子又はグリコシド結合した糖残基をそれぞれ示す)

(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc-R (式4)

(但し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、SO<sub>4</sub>-6は6位の水酸基が硫酸化されていることを、-Rは水素原子又はグリコシド結合した糖残基をそれぞれ示す)

【0013】また本発明は、本発明DNAを細胞に移入し、次いで該細胞を培養する工程を少なくとも含む、硫酸化糖の製造方法(以下「本発明製造方法2」ともいう)を提供する。この製造方法の好ましい態様として、本発明DNA及びフコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを共に細胞に移入する態様が挙げられる。

【0014】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の実施の形態を説明する。なお、以下特にことわりがない限り、Galはガラクトース残基を、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸残基を、Fucはフコース残基を、 $\beta$  1-3は $\beta$  1-3グリコシド結合を、 $\beta$  1-4は $\beta$  1-4グリコシド結合を、 $\alpha$  2-3は $\alpha$  2-3グリコシド結合を、 $\alpha$  1-3は $\alpha$  1-3グリコシド結合を、SO<sub>4</sub>-6は6位の水酸基が硫酸化されていることを、Cerはセラミド残基をそれぞれ示す。

【0015】<1>本発明ポリペプチド

本発明ポリペプチドは、以下の(a)又は(b)のポリペプチドである。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列 (a) において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (式1)

この中でも、(a)のポリペプチドが好ましい。

【0016】なお本明細書中において、「1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1 (GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc)で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド」とは、硫酸基供与体から、GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAcの非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を選択的に転移する活性を実質的に害さない1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいことを示す。

【0017】すなわち、天然に存在するポリペプチドには、それをコードするDNAの多形や変異の他、生成後のポリペプチドの生体内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転位等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないポリペプチドと実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に若干の差違があってもその機能については大きな違いが認められないものも、本発明ポリペプチドに包含される。人為的にポリペプチドのアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン2 (IL-2)のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている(Science, 224, 1431(1984))。また、ある種のポリペプチドは、活性には必須でないペプ

チド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるポリペプチドに存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、または活性型ポリペプチドへの転換に際して除去される。このようなポリペプチドは、一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を有するポリペプチドであり、本発明ポリペプチドに包含されるものである。

【0018】なお本明細書における「数個のアミノ酸」とは本発明ポリペプチドの活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば400アミノ酸残基からなるポリペプチドの場合、20程度以下の数を示す。

【0019】なお、硫酸基供与体から、GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAcで示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性は、後述の本発明ポリペプチド活性の測定方法を用いることによって測定できる。よって当業者であれば、本発明ポリペプチド活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。

【0020】なおこのポリペプチドは、もともとはマウスから得られたものであるが、遺伝子工学的手法や化学合成等により製造されたポリペプチドも当然に包含される。また本発明ポリペプチドには、以下の(a)又は(b)のポリペプチドも包含される。

(a) 配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (式1)

【0021】この中でも(a)のポリペプチド(配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド)が、前記の本発明ポリペプチドの(a)(配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド)と85%以上の相同性を有することから好ましい。このように、本発明ポリペプチドには、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと85%以上の相同性を有するポリペプチドも包含される。

【0022】なおこのポリペプチドは、もともとはヒトから得られたものであるが、遺伝子工学的手法や化学合成等により製造されたポリペプチドも当然に包含される。

【0023】また本発明ポリペプチドには、下記の性質

を有するポリペプチドも包含される。

①作用：硫酸基供与体から、下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する。

GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (式1)

②基質特性：コンドロイチン、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、脱硫酸化ケラタン硫酸、CDSNS-ヘパリン、ブタ胃由来ムチン、ウシ顎下腺由来ムチン及び下記式2で示されるオリゴ糖には硫酸基を転移しない。

Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (式2)

③N末端のアミノ酸配列

配列番号2におけるアミノ酸番号1~48で表されるアミノ酸配列からなる。

【0024】なお本発明ポリペプチドにおいて、硫酸基供与体としては3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸(以下、PAPSともいう)が好ましい。これら本発明ポリペプチドは、本発明によりそのアミノ酸配列や性質が開示されたので、天然物からの単離・精製や、化学合成等によって製造することも可能であるが、後述の本発明DNAを用いて製造することが好ましい。本発明DNAを用いた本発明ポリペプチドの製造方法については後述する。なお本発明ポリペプチドは、必ずしも単独のポリペプチドでなくともよく、必要により融合タンパク質の一部となっていてよい。例えば、本発明ポリペプチドと、発現に必要な他のポリペプチドとを含む融合ポリペプチドが例示される。

【0025】本発明ポリペプチドは、硫酸基供与体から、GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAcの非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に特異的に硫酸基を転移する作用を有しているので、非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位特異的硫酸化やGlyCAM-1構造を有する糖鎖等の合成に利用できる。

【0026】<2>本発明DNA

本発明DNAは、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNAである。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (式1)

この中でも(a)のポリペプチドをコードするDNAが好ましい。

【0027】このようなDNAとして具体的には、例えば配列番号1において塩基番号470~1918で表される塩基配列を含むDNAが例示される。なおこのDNA

は、もともとはマウス由来のものであるが、その由来は限定されず遺伝子工学的手法や化学合成等により製造されたDNAも当然に包含される。

【0028】また本発明DNAには、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNAも包含される。

(a) 配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつ硫酸基供与体から下記式1で示されるオリゴ糖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に硫酸基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc (式1)

この中でも(a)のポリペプチドをコードするDNAは、当該DNAによってコードされる本発明ポリペプチドが配列番号2のアミノ酸配列からなる本発明ポリペプチドと85%以上の相同性を有することから好ましい。

【0029】このようなDNAとして具体的には、例えば配列番号3において塩基番号390~1841で表される塩基配列を含むDNAが例示される。なおこのDNAは、もともとはヒト由来のものであるが、その由来は限定されず遺伝子工学的手法や化学合成等により製造されたDNAも当然に包含される。

【0030】なお、遺伝暗号の縮重による異なった塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。また、本発明DNAには、本発明DNAに相補的なDNA又はRNAも包含される。さらに本発明DNAは、本発明ポリペプチドをコードするコード鎖のみの一本鎖であってもよく、この一本鎖およびこれと相補的な塩基配列を有するDNA鎖またはRNA鎖からなる二本鎖であってもよい。

【0031】なお前記<1>で述べた通り、本発明ポリペプチドとは構造的に若干の差違があっても、その機能については大きな違いが認められないようなポリペプチドも本発明ポリペプチドに包含される。本発明DNAも同様に、本発明ポリペプチドとは構造的に若干の差違があっても、その機能については大きな違いが認められないようなポリペプチドをコードするDNAも、本発明DNAに包含される。

【0032】具体的には、DNAの多形や変異等によって本発明DNAとは構造的に若干の差違があるが、本発明ポリペプチドとほぼ同等の機能を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。

【0033】また染色体由来の本発明ポリペプチドの遺伝子は、コード領域にイントロンを含むことが予想されるが、そのようなイントロンで分断されているDNA断片であっても、本発明ポリペプチドをコードする限り、本発明DNAに包含される。すなわち、本明細書におい

て「コードする」とは、転写時にプロセッシング等を受けて最終的に目的のポリペプチドを発現し得る塩基配列を有することも包含する。

【0034】なお本発明DNAにおいて、硫酸基供与体としてはPAPSが好ましい。

【0035】1. 本発明DNAの製造方法

本発明DNAは、その塩基配列が本発明により明らかにされたので、その配列に基づいて合成し、あるいはその配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR法(ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法)によって染色体DNAあるいはmRNAから本発明DNAを増幅することによって取得することも可能である。なお本発明DNAは、後記実施例に示すように、以下に示す各工程からなるcDNAクローニングによって初めて得られたものである。

【0036】(1)マウス由来の本発明DNAの製造

①PCR用オリゴヌクレオチドプライマーの作製。

②マウスの全RNAを鋳型とした逆転写PCR(RT-PCR)による増幅。

【0037】③PCR産物を用いた、マウスcDNAライブラリーからの本発明DNAのスクリーニング。

【0038】(2)ヒト由来の本発明DNAの製造

①上記(1)③で得られたcDNAを用いた、ヒトcDNAライブラリーからの本発明DNAのスクリーニング。

【0039】②得られたcDNAの塩基配列解析。

しかし本発明DNAの製造方法はこれに限定されるものではなく、他の公知のcDNAクローニングの手法によっても製造することができる。

【0040】以下に、本発明DNAの製造方法の一例を具体的に説明する。

【0041】(1)PCR用オリゴヌクレオチドプライマーの作製。

マウスのコンドロイチン 6-スルホトランスフェラーゼの触媒部位と相同性を有するマウスの発現配列tag(expressed sequence tag)(EST)配列(Genbank accession番号: AA103962)をベースにして、オリゴヌクレオチドプライマー(センスプライマー及びアンチセンスプライマー)を作製する。オリゴヌクレオチドプライマーとして具体的には、センスプライマーとして5'-GTCGTCGGACTGTGGACGA-3'(配列番号5)が、アンチセンスプライマーとして5'-CCCAGAGCGTGGTAGTCTGC-3'(配列番号6)がそれぞれ挙げられ、かつ好ましい。

【0042】(2)マウスの全RNAを鋳型としたRT-PCRによる増幅。

全RNAは、公知の方法(例えば、Kingston, R. S., (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 14, Unit 4.2, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New Yorkなど)で得ることができる。材料は、本発明ポリペプチドのmRNAを発現している材料であれば限定されないが、マウスの胚、例

えば13日胚等を用いることができる。

【0043】この全RNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCRにより、本発明ポリペプチドの部分的cDNAを増幅することができる。PCRは、通常の方法と同様に行えばよい。

【0044】(3)PCR産物を用いた、マウスcDNAライブラリーからの本発明DNAのスクリーニング。  
上記(2)のRT-PCRで得られたPCR産物を<sup>32</sup>P等でラベルし、cDNAライブラリーからcDNA(本発明DNA)断片をスクリーニングするためのハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。用いることができるマウスcDNAライブラリーは特に限定されないが、例えばマウス胚cDNAを保持するλgt11ライブラリー(λgt11マウス胚cDNAライブラリー)を例示することができる。

【0045】ハイブリダイゼーションは公知の方法(例えば、J. Biol. Chem., 270, 18575-18580(1995))により行うことができる。DNAインサートはEcoRI消化によって陽性クローンから分離し、例えばpBluescript II SK-(ストラタジーン(STRATAGENE)社)等にサブクローニングする。その後塩基配列を、例えばジデオキシシチンエントナーミネーション法(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463-5467(1977))等の公知の方法により決定することができる。

【0046】これら一連の方法により得られた本発明DNAの塩基配列、及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号1に、アミノ酸配列のみを配列番号2に示す。

【0047】(4)上記で得られたcDNA(マウス由来)を用いた、ヒトcDNAライブラリーのスクリーニング及び塩基配列解析。

上記で得られたcDNA(マウス由来)を用いてヒトのcDNAライブラリー(例えば、ヒト胎児脳のcDNAを保持するλgt11ライブラリー等)をスクリーニングすることによって、ヒト由来の本発明DNAを得ることができる。この塩基配列も、上記と同様の方法によって決定することができる。

【0048】この方法により得られた本発明DNAの塩基配列、及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号3に、アミノ酸配列のみを配列番号4に示す。

【0049】2. 本発明DNAを用いた本発明ポリペプチドの製造方法

本発明DNAを移入した細胞を、好適な培地で培養し、本発明DNAがコードするポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物から本発明ポリペプチドを採取することによって、本発明ポリペプチドを製造することができる。

【0050】本発明DNAを移入した細胞は、公知の発現ベクターに本発明DNAの断片を挿入して組換プラスミドを構築し、この組換プラスミドを細胞に移入するこ

とによって得ることができる。ここで用いる本発明DNAは、本発明DNAである限りにおいて特に限定されないが、配列番号1における塩基番号470～1918で表される塩基配列を含むDNAが好ましく、なかでも配列番号1における塩基番号467～1921で表される塩基配列からなるDNAが特に好ましい。また配列番号3において塩基番号390～1841で表される塩基配列を含むDNAも好ましく、なかでも配列番号3における塩基番号387～1844で表される塩基配列からなるDNAが特に好ましい。

【0051】細胞としては大腸菌等の原核細胞や、哺乳類細胞等の真核細胞が例示される。大腸菌などの原核細胞を用いた際は、本発明DNAの発現によって生じるポリペプチドに糖鎖の付加が起こらないため、糖鎖が付加されていない本発明ポリペプチドを得ることが可能であり、また、哺乳類細胞等の真核細胞を用いた場合は、本発明DNAの発現によって生じるポリペプチドに糖鎖が付加しうするため、糖鎖を含む本発明ポリペプチドの形態で得ることも可能である。

【0052】この製造方法においては、タンパク質の製造に通常用いられる宿主ベクター系を使用することができ、例えば、COS-7細胞等の哺乳類由来の培養細胞と、pcDNA3発現ベクター(インビトロジェン(Invitrogen)社)等の哺乳類細胞発現ベクターとの組み合わせを採用することが好ましい。培地や培養条件は、用いる宿主すなわち細胞に合わせて適宜選択される。

【0053】本発明DNAは直接発現させてもよいし、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。また、本発明DNAは全長を発現させてもよいし、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

【0054】培養物からの本発明ポリペプチドの採取は、公知のポリペプチドの抽出、精製方法によって行うことができる。なお培養物には、培地および当該培地中の細胞が含まれる。

【0055】本発明ポリペプチドの抽出方法として具体的には、ホモジナイズ、ガラスビーズミル法、音波処理、浸透ショック法、凍結融解法等の細胞破碎による抽出、界面活性剤抽出、またはこれらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

【0056】例えば、本発明ポリペプチドを上記培養物から抽出する場合には、ホモジナイズが好ましい。より具体的には、培養物から細胞を集め、これに緩衝液(界面活性剤を適宜含有させてもよい)を添加して細胞懸濁液とし、ホモジナイザーでホモジナイズした後、遠心分離等の分離手段で細胞残渣と上清液(抽出液)とに分離することにより抽出を行うことができ、かつ好ましい。

【0057】抽出液からの本発明ポリペプチドの精製方法として具体的には、例えば硫酸アンモニウム(硫酸)や硫酸ナトリウム等による塩析、遠心分離、透析、限外濾過法、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグ



ラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等や、これらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

【0058】精製されたポリペプチドのアミノ酸配列、作用、基質特異性等を分析し、前記<1>で説明した本発明ポリペプチドの物性と比較することにより、本発明ポリペプチドの製造が確認できる。

【0059】本発明DNAは、本発明ポリペプチドの大量生産や、生体内(細胞)でのGlyCAM-1の人工的合成等への利用が期待される。

#### 【0060】<3>本発明製造方法1

本発明製造方法1は、本発明ポリペプチドを、下記式3で示される糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、下記式4で示される硫酸化糖の製造方法である。

$\text{GlcNAc}-\text{R}$  (式3)

$(\text{SO}_3-6)\text{GlcNAc}-\text{R}$  (式4)

(-Rは水素原子又はグリコシド結合した糖残基を示す)

【0061】本発明製造方法1において用いることができる本発明ポリペプチドは、本発明ポリペプチドである限りにおいて特に限定されない。またここで用いることができる本発明ポリペプチドは、本発明ポリペプチドの作用が実質的に害されない限りにおいては完全に精製されている必要はなく、部分精製されたものや、細胞抽出物であってもよい。

【0062】本発明製造方法1は、本発明ポリペプチドが、硫酸基供与体から硫酸基を、非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に特異的に転移する酵素活性を有していることを見出し、これを硫酸化糖の製造に応用したものである。従って本発明製造方法1において最も重要かつ必須なのは上記式3及び4における-R以外の部分であり、逆に-Rは任意の構造で良く、糖残基の構造も特に限定されない。例えば-Rは、末端に脂質(例えばセラミド残基等)を有する糖鎖(糖脂質)等であってもよい。

【0063】上記式3及び4は、それぞれ下記式5及び6で示される糖鎖であることが好ましい。

$\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{R}'$  (式5)

$(\text{SO}_3-6)\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{R}'$  (式6)

(-R'は水素原子又はグリコシド結合した糖残基を示す)

なおR'は、水素原子又は1~15糖の糖鎖が好ましく、水素原子又は1~10糖の糖鎖がより好ましく、水素原子又は1~2糖の糖鎖が特に好ましく、水素原子が極めて好ましい。また-R'が糖鎖の場合、-R'は(-3Galβ1-4GlcNAcβ1-) (ラクトサミン)の繰返し構造を基本骨格とするものが好ましい。この場合、-R'の基本骨格にはシアル酸残基、フコース残基、硫酸基等が付加していても良い。

【0064】本発明製造方法1において、本発明ポリペプチドを、上記式3で示される糖鎖に作用させる場合、硫酸基供与体を共存させておくことが好ましい。なお本発明製造方法1において、硫酸基供与体としてはPAPSが好ましい。

【0065】本発明ポリペプチドを上記式3で示される糖鎖に作用させる反応は、本発明ポリペプチド、上記式3で示される糖鎖及び硫酸基供与体を共存させることにより行うことができる。この時のpHは、本発明ポリペプチドの活性が保持されている限りにおいて特に限定されないが、中性pH付近(例えばpH6.8程度)の条件下で反応を行うことが好ましく、該pH下で緩衝作用を有する緩衝液中で反応を行うことがより好ましい。またこの時の温度は、本発明ポリペプチドの活性が保持されている限りにおいて特に限定されないが、30~40℃程度が例示される。また本発明ポリペプチドの活性を増加させる物質がある場合は、その物質を添加しても良い。反応時間は、用いる糖鎖、硫酸基供与体及び本発明ポリペプチドの量、並びにその他の反応条件に応じて当業者が適宜決定できる。反応の際、 $\text{MnCl}_2$ 等を共存させてもよい。

【0066】少量生産であれば、上記式3で示される糖鎖及び硫酸基供与体の共存下に、本発明ポリペプチドを存在させて該ポリペプチドを作用させれば良いが、大量生産する場合は、適当な固相(ビーズ等)に本発明ポリペプチドを結合させた固定化酵素や、限外濾過膜、透析膜等を用いる膜型リアクター等を用いて連続的に本発明ポリペプチドを作用させることもできる。また硫酸基供与体を再生(合成)するバイオリアクターを組み合わせ用いても良い。

【0067】本発明ポリペプチドの作用により、上記式3で示される糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に特異的に硫酸基が導入され、上記式4で示される糖鎖が生成する。反応液から上記式4で示される糖鎖を回収するには、通常の糖鎖の分離、精製の手法を用いることができる。例えば吸着クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、濾紙電気泳動法、濾紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、有機溶媒(例えばアルコール、アセトン等が好ましい)による分画、あるいはこれらの組み合わせ等の操作により行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0068】得られた上記式4で示される糖鎖は、例えばGlyCAM-1やその糖鎖基本骨格製造の中間体として利用され得る。

#### 【0069】<4>本発明製造方法2

本発明製造方法2は、本発明DNAを細胞に移入し、次いで該細胞を培養する工程を少なくとも含む、硫酸化糖の製造方法である。



【0070】このような工程を少なくとも含む限りにおいては、他の工程を追加したとしても本発明製造方法2に包含される。例えば、本発明DNAを移入した細胞を好適な培地で培養し、その培養物から細胞を分離し、当該細胞上に発現した硫酸化糖を採取することによる硫酸化糖の製造方法も、本発明製造方法2に包含される。

【0071】なお、硫酸化糖は必ずしも細胞から分離、精製する必要はなく、硫酸化糖が細胞表面に発現した細胞自体を所望の場合は、培養物中の細胞を採取してそのまま用いることもできる。

【0072】本発明DNAの細胞への移入は、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム、ポリブレン等を用いた公知の方法や、その他遺伝子工学分野において公知の方法で行うことができる。

【0073】細胞に移入させる本発明DNAは、公知の発現ベクターに本発明DNAが挿入された組換プラスミドの形態で細胞に移入することが好ましい。ここで用いる本発明DNAは、本発明DNAである限りにおいて特に限定されないが、配列番号1における塩基番号470～1918で表される塩基配列を含むDNAが好ましく、なかでも配列番号1における塩基番号467～1921で表される塩基配列からなるDNAが特に好ましい。

【0074】細胞としては大腸菌等の原核細胞や、哺乳類細胞等の真核細胞が例示される。この製造方法においては、タンパク質の製造に通常用いられる宿主ベクター系を使用することができ、例えば、COS-7細胞等の哺乳類由来の培養細胞と、pcDNA3発現ベクター(インビトロジェン(Invitrogen)社)等の哺乳類細胞発現ベクターとの組み合わせを採用することが好ましい。培地や培養条件は、用いる宿主すなわち細胞に合わせて適宜選択され、当該条件下で培養することによって培養物を得ることができる。

【0075】培養物からの硫酸化糖の採取は、公知の糖脂質の抽出、精製方法によって行うことができる。なお培養物には、培地および当該培地中の細胞が包含される。糖脂質の抽出方法として具体的には、メタノール、クロロホルム等による有機溶媒抽出、ホモジナイズ、音波処理等の細胞破碎による抽出、またはこれらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。培養物中の細胞に対してこのような抽出操作を行うことにより硫酸化糖を含む抽出物を得ることができる。

【0076】抽出液からの硫酸化糖の分離、精製は、通常の糖鎖の分離、精製の手法を用いることができる。例えば吸着クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、濾紙電気泳動法、濾紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、有機溶媒(例えばアルコール、アセトン等が好ましい)による分画、あるいはこれらの組み合わせ等の操作により行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0077】本発明方法2により製造される硫酸化糖は、本発明DNAの細胞内への移入により発現された本発明ポリペプチドの作用により、糖鎖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基が硫酸化される過程を経て細胞表面に発現する。発現する硫酸化糖は、少なくとも下記式7の糖鎖骨格を有する。

【0078】 $\text{NeuAc} \alpha 2-3\text{Gal} \beta 1-4(\text{SO}_4-6)\text{GlcNAc-R}$

(-Rは水素原子又はグリコシド結合した糖残基を示す。なお、水素原子又はグリコシド結合した糖残基には、セラミド等の脂質が結合していても良い) この糖鎖骨格は、6-硫酸化シアリルルイスXセラミド(6-Sulfo SLxセラミド)及びSL2L4( $\text{NeuAc} \alpha 2-3\text{Gal} \beta 1-4(\text{SO}_4-6)\text{GlcNAc} \beta 1-3(\text{SO}_4-6)\text{Gal} \beta 1-4(\text{SO}_4-6)\text{GlcNAc}$ )に反応するが、6'-硫酸化シアリルルイスXセラミド(6'-Sulfo SLxセラミド)やシアリルパラグロボシド(SPG)には反応しない抗体(反応に必要な最小構造が $\text{NeuAc} \alpha 2-3\text{Gal} \beta 1-4(\text{SO}_4-6)\text{GlcNAc}$ である)により認識される。このような抗体は、6-硫酸化シアリルルイスXセラミドを用いて、通常の抗体の調製方法により調製することができる。抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0079】モノクローナル抗体の調製は、KohlerとMilsteinの方法(Nature 256, 495-497(1975))によって行うことができる。例えば、6-硫酸化シアリルルイスXセラミドをSalmonella minnesota等の菌体に吸着させ、これを用いてマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ等の被免疫動物の腹腔内、皮下あるいは足蹠(footpad)に投与した後に脾臓又は膝窩リンパ節を摘出し、これらから採取した細胞と腫瘍細胞株であるミエローマ細胞とを細胞融合させてハイブリドーマを樹立し、得られたハイブリドーマを連続増殖させ、さらに得られたハイブリドーマから6-硫酸化シアリルルイスXセラミド及びSL2L4に反応するが、6'-硫酸化シアリルルイスXセラミドやシアリルパラグロボシドには反応しない抗体(反応に必要な最小構造が $\text{NeuAc} \alpha 2-3\text{Gal} \beta 1-4(\text{SO}_4-6)\text{GlcNAc}$ である抗体)を継続的に産生する細胞株を選別する。こうして選別された株を好適な培地で培養することにより、培地中にモノクローナル抗体が得られる。あるいは、マウスの腹腔などの生体内にて前記ハイブリドーマを培養することによって、モノクローナル抗体を大量に製造することができる。細胞融合に用いる細胞としては、脾細胞以外にリンパ節細胞および末梢血中のリンパ細胞等を用いることもできる。ミエローマ細胞株は、異種細胞種由来のものに比べ、同種細胞株由来のものが望ましく、安定な抗体産生ハイブリドーマを得ることができる。このような抗体としては、後述の実施例において説明するG72抗体等が挙げられる。

【0080】本発明製造方法2によって製造された硫酸化糖は、以上に説明した抗体を用いてその製造を確認することができる。抗体を用いた確認は、公知の免疫学的手法を用いることができる。例えばイムノブロッティング

グ法、標識化免疫測定法(例えばEIA法、ELISA法、ラジオイムノアッセイ法、蛍光イムノアッセイ法等)、硫酸化糖が細胞表面に発現された細胞における当該硫酸化糖を確認する場合は、フローサイトメトリー等の手法を用いることができる。もちろん、本発明製造方法2によって製造される硫酸化糖は、公知の糖鎖構造解析技術を用いて確認することもできる。

【0081】なお本発明製造方法2において、本発明DNAを細胞移入する際に、同時にフコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAも共に細胞に移入することができる。すなわち本発明製造方法2には、本発明DNA及びフコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを共に細胞に移入し、次いで該細胞を培養する工程を少なくとも含む、硫酸化糖の製造方法も包含される。

【0082】移入するフコシルトランスフェラーゼは特に限定されないが、フコシルトランスフェラーゼIVは、フコースをN-アセチルラクトサミンに転移することによってルイスX構造(Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc)を形成できることが知られている(J. Biol. Chem., 266, 17467-17477(1991), Cell, 63, 1349-1356(1990))ことから好ましい。フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAは、公知のフコシルトランスフェラーゼのcDNAを適当な発現ベクターに組込んで、本発明DNAと共に細胞に移入することができる。好ましい発現ベクター等は、本発明DNAに用いる発現ベクターと同様である。

【0083】この方法により製造される硫酸化糖は、本発明DNAおよびフコシルトランスフェラーゼのcDNAの細胞内への移入により発現された本発明ポリペプチドおよびフコシルトランスフェラーゼの作用により、糖鎖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基が硫酸化され、またフコースがN-アセチルラクトサミンに転移される過程を経て細胞表面に発現する。発現する硫酸化糖は、少なくとも下記式8の糖鎖骨格を有する。Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc-R (式8)

(-Rは水素原子又はグリコシド結合した糖残基を示す。なお、水素原子又はグリコシド結合した糖残基には、セラミド等の脂質が結合していても良い)  
この糖鎖骨格は、6-硫酸化ルイスX (Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc; 6-sulfo LeX)構造に特異的に反応し、ルイスX (Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc; LeX)や6'-硫酸化ルイスX ((SO<sub>4</sub>-6)Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc; 6'-sulfo LeX)構造には反応しないモノクローナル抗体により認識される。このような抗体は、6-硫酸化ルイスXセラミド(Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer)を用いて、通常の抗体の調製方法により調製することができる。抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0084】モノクローナル抗体の調製は、前述と同様の方法で行うことができる。ここで免疫に用いる抗原としては、例えば、6-硫酸化ルイスXセラミドをSalmonel

la minnesota等の菌体に吸着させたものが好ましい。

【0085】上述の方法で作製したハイブリドーマから、6-硫酸化ルイスX構造に特異的に反応し、ルイスXや6'-硫酸化ルイスX構造には反応しないモノクローナル抗体を継続的に産生する細胞株を選別する。こうして選別された株を好適な培地で培養することにより、培地中にモノクローナル抗体が得られる。あるいは、マウスの腹腔などの生体内にて前記ハイブリドーマを培養することによって、モノクローナル抗体を大量に製造することができる。細胞融合に用いる細胞についても上述と同様である。

【0086】このような抗体としては、後述の実施例において説明するAG223抗体等が挙げられる。この方法によって製造された硫酸化糖は、以上に説明した抗体を用いてその製造を確認することができる。抗体を用いた確認は、公知の免疫学的手法を用いることができ、もちろん公知の糖鎖構造解析技術を用いて確認することもできる。これらの説明は上述と同様である。

【0087】得られた上記式7又は8で示される糖鎖は、例えばGlyCAM-1やその糖鎖基本骨格製造の中間体として利用され得る。

【0088】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

<1>本実施例中で共通して用いた材料及び方法

(1) 材料

【0089】<sup>35</sup>S-PAPS(3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸; 58.1GBq/mmol)(デュボンNEN(DuPont NEN)社)  
<sup>3</sup>H-NaBH<sub>4</sub>(16.3GBq/mmol)及び $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP(110GBq/nmol)(アマシャム(Amersham)社)

【0090】コンドロイチン硫酸A(クジラ軟骨由来)、コンドロイチン硫酸C(サメ軟骨由来)、デルマトン硫酸、CD SNS-ヘパリン(N, O-硫酸基を脱硫酸化後、再N-硫酸化したヘパリン; completely desulfated and N-resulfated heparin)及びストレプトコッカス $\beta$ -ガラクトシダーゼ(Streptococcus  $\beta$ -galactosidase)(生化学工業株式会社)

【0091】非標識PAPS、ブタ胃ムチン、ウシ顎下腺由来ムチン(シグマ(Sigma)社)

Hiload Superdex 30 HR 16/60、高速脱塩カラム(fast desalting column)HR 10/10(ファルマシアバイオテック(Parmacia Biotech)社)

Partisil SAX-10(ワットマン(Whatman)社製)

【0092】マウス7日胚5'-STRETCH PLUS  $\lambda$ gt11 cDNAライブラリー(クローンテック(CLONTECH)社)

抗ルイスX(Lewis X)抗体 LeuM1(ベクトン・ディッキンソン(Becton Dickinson)社)

【0093】ケラタン硫酸(ウシ角膜由来)、Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(本明細書中において「L1L1」ともいう)(生化学工業株式会社)

【0094】部分的脱硫酸化ケラタン硫酸(硫酸基/グルコサミン=0.62)は、角膜由来のケラタン硫酸から(J. Biol. Chem., 272, 32321-32328(1997), J. Biochem. (Tokyo) 86, 1323-1329(1979))記載の方法で調製した。

【0095】GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcは、L1L1を $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化することにより調製した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化のための反応混合液100  $\mu$ Lには、2 mgのL1L1、5  $\mu$ molesの酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)、4.0mUの $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有させた(J. Biochem. (Tokyo) 80, 9-17(1976))。この反応混合液を37℃で24時間インキュベートした。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化後、GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcをSuperdex 30クロマトグラフィーで精製し、凍結乾燥により脱塩した。

【0096】Gal  $\beta$ 1-4-<sup>3</sup>H-(SO<sub>4</sub>-6)2,5-アンヒドロマンニトール(anhydromannitol)及び(SO<sub>4</sub>-6)2,5-<sup>3</sup>H-アンヒドロマンニトールは、ケラタン硫酸をN-脱アセチル化、脱アミノ化、NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>還元、部分的酸加水分解の順に反応させて製造した(Glycobiology, 6, 51-57(1996), Biochem. J. 235, 225-236(1986))。

【0097】本実施例で用いた合成糖脂質は次の通りである；シアリルルイスXセラミド(sialyl Lewis X ceramide)=NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc  $\beta$ 1-Cer；6-硫酸化シアリルルイスXセラミド(6-sulfo sialyl Lewis X ceramide)=NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc  $\beta$ 1-Cer；6'-硫酸化シアリルルイスXセラミド(6'-sulfo sialyl Lewis X ceramide)=NeuAc  $\alpha$ 2-3(SO<sub>4</sub>-6)Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc  $\beta$ 1-Cer；6,6'-bis-硫酸化シアリルルイスXセラミド(6,6'-bis-sulfo sialyl Lewis X ceramide)=NeuAc  $\alpha$ 2-3(SO<sub>4</sub>-6)Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc  $\beta$ 1-Cer(Carbohydr. Res., 209, c1-c4(1991), Carbohydr. Res., 285, c1-c8(1996), J. Med. Chem., 39, 1339-1343(1996))。これらの糖脂質は岐阜大学農学部の本曾 真博士より恵与されたものを使用した。アシアロ(asialo)化合物は、対応する合成糖脂質をArthrobacter ureafaciens由来ノイラミナーゼ(neuraminidase) (ナカライテスク(Nakarai Tesque)社)で消化することにより調製した。シアリル化パラグロボシド(sialylated paraglobosides；NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc  $\beta$ 1-Cer及びNeuAc  $\alpha$ 2-6Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc  $\beta$ 1-Cer)は、ヒトの腸癌及び肝癌組織より調製した。

【0098】NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc  $\beta$ 1-3(SO<sub>4</sub>-6)Gal  $\beta$ 1-4(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc(本明細書中において「SL2L4」ともいう)及びGlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcは生化学工業株式会社の吉田圭一より供与され、前者については還元的アミノ化によりコレステリルアニリン(cholesteryl aniline)に結合させた(Blood, 82, 2797-2805(1993))。

【0099】(2) 本発明DNAの分離

(2-1) マウス由来の本発明DNAの分離

マウスのコンドロイチン 6-スルホトランスフェラーゼの触媒部位と相同性を有するマウスの発現配列tag(expressed sequence tag) (EST)配列(Genbank accession番号：AA103962)を、マウスの13日胚の全RNAを鋳型としたRT-PCR法により増幅した。

【0100】センスプライマー GTGCTCGGACTGGTGGACGA(配列番号5)及びアンチセンスプライマー CCCAGAGCGTGCTAGTCTGC(配列番号6)をPCR増幅に用いた。PCR増幅は、94℃で3分、次いで94℃で0.5分、60℃で1分及び72℃で1分を35サイクルで行った。PCR産物(368bp)を、Megaprime<sup>TM</sup> DNA labeled kit(アマシヤム(Amersham)社)で<sup>32</sup>P-ラベルし、 $\lambda$ gt11マウス7日胚のcDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。

【0101】ハイブリダイゼーションは(J. Biol. Chem., 270, 18575-18580(1995))に記載の方法により行った。DNAインサートはEcoRI消化によって陽性 $\lambda$ gt11クローンから分離し、pBluescript II SK-(ストラタジーン(STRATAGENE)社)にサブクローニングした。塩基配列は、アプライド・バイオシステム(Applied Biosystems)社の自動シーケンサーを用いたジデオキシチンエントミネーション法(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463-5467(1977))により決定した。

【0102】(2-2) ヒト由来の本発明DNAの分離  
上記で得られたマウス由来の本発明DNAを、メガプライム DNA ラベリングシステム(Megaprime DNA labeling systems；アマシヤム(Amersham)社)を用いて<sup>32</sup>Pラベルした。これをプローブとして、ヒト胎児脳のcDNAを保持する $\lambda$ gt11ライブラリー(クローンテック(CLONTECH)社)をスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、J. Biol. Chem., 272, 32321-32328(1997)に記載の方法で行った。

【0103】DNAインサートはEcoRI消化によって陽性 $\lambda$ gt11クローンから分離し、pBluescript II SK-(ストラタジーン(STRATAGENE)社)にサブクローニングした。塩基配列は、前記のマウス由来の本発明DNAと同様の方法で決定した。

【0104】(3) 発現ベクターの構築

本発明ポリペプチドのオープン・リーディング・フレームをコードするcDNAフラグメント(マウス由来の本発明DNA)を、クローニングしたマウス由来のcDNAフラグメントを鋳型としてPCRにより増幅した。センスプライマー ACGAATTCGGGATGAAGGTATTTCGCAGG(配列番号7)及びアンチセンスプライマー ATGAATTCCTCAAGCCGGGCTTCCTGAG(配列番号8)をPCR増幅に用いた。PCR増幅は、5%(v/v)ジメチルスルホキシド中、94℃で3分、次いで94℃で1分、60℃で1分及び72℃で2分を35サイクルで行った。本発明ポリペプチドのオープンリーディングフレームを含むPCR産物(配列番号1における塩基番号467-1921)をEcoRIで消化し、pcDNA3発現ベクター

(インビトロジェン(Invitrogen)社)にサブクローニングした。DNAフラグメントが正しい方向に挿入された組換えプラスミド(pcDNA3-GlcNAc6ST)を発現に用いた。DNAフラグメントが逆方向に挿入された組換えプラスミド(p cDNA3-GlcNAc6STA)は対照実験に用いた。

【0105】また、ヒト由来の本発明DNAを用いて上記と同様に発現ベクターを構築した。すなわち、CTGAATTC GGAATGAAGGTGTCCGTA (配列番号9)及び GAGAATTC TAG AGACGGGCTCCGA (配列番号10)をプライマーとし、クローニングしたヒト由来のcDNAフラグメントを鋳型としてPCRを行い、本発明ポリペプチドのオープンリーディングフレームを含むPCR産物(配列番号3における塩基番号387-1844)を得た。これをEcoRIで消化し、pcDNA3発現ベクターにサブクローニングした。DNAフラグメントが正しい方向に挿入された組換えプラスミド(pcDNA3-hGlcNAc6ST)を発現に用い、DNAフラグメントが逆方向に挿入された組換えプラスミド(pcDNA3-hGlcNAc6STA)は対照実験に用いた。

【0106】既にクローニングされているマウスのフコシルトランスフェラーゼIV遺伝子の1544bpのフラグメント(J. Biochem. (Tokyo) 119, 302-308 (1996))を、上述と同様にpcDNA3発現ベクターのBamHI及びEcoRI部位にサブクローニングした。DNAフラグメントが正しい方向に挿入された組換えプラスミド(pcDNA3-FucTIV)を用いた。

【0107】(4)本発明DNAのCOS-7細胞における一過性発現

DEAE-デキストラン法(Aruffo, A. (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 14, Unit 16.13, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York)により、15  $\mu$ gの発現プラスミドをCOS-7細胞(理研細胞バンクより入手;  $3 \times 10^6$ 細胞/10cmディッシュ)にトランスフェクトした。これを10%ウシ胎児血清(fetal calf serum)を含むダルベッコの改変最小必須培地(Dulbecco-modified minimum essential medium)中で65時間培養した。その後細胞をリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄し、ディッシュをこすって細胞をはがした。この細胞を集めて0.25M シュークロース、10mM Tris-HCl (pH7.2)及び0.5% TritonX-100を含有する溶液(1ディッシュあたり1.5mL)中で、ダウンスホモジナイザー(Dounce homogenizer)を用いてホモジナイズした。ホモジネートを10,000 x gで15分間遠心し、上清を集めた。この上清を以下「抽出物」という。FACS(fluorescence-activated cell sorter)による分析のために、トランスフェクトされた細胞を48時間培養し、25cm<sup>2</sup>培養フラスコに移して( $3 \times 10^6$ 細胞/フラスコ)さらに36時間培養した。

【0108】(5)種々の高分子量基質への硫酸基転移活性の分析

種々のグリコサミノグリカン(糖タンパク質)を基質(受容体)として用い、硫酸基転移活性を公知の方法で測定した(J. Biol. Chem., 272, 32321-32328 (1997))。ムチンを受容体として用

いた場合は、2.5  $\mu$ molのイミダゾール-塩酸(pH6.8)、0.25  $\mu$ molのCaCl<sub>2</sub>、0.1  $\mu$ molのジチオスレイトール、0.1  $\mu$ molのNaF、0.1  $\mu$ molのAMP、2.0  $\mu$ gのムチン、50pmolの<sup>35</sup>S-PAPS(約5.0 $\times 10^5$ cpm)及び5  $\mu$ Lの抽出物を含む50  $\mu$ Lの溶液を37℃で1時間インキュベートした。

【0109】高速脱塩カラムを用いてムチンを単離し、ムチンに取り込まれた放射活性を測定した。

【0110】(6)オリゴ糖への硫酸基転移活性の分析 2.5  $\mu$ molのイミダゾール-塩酸(pH6.8)、0.5  $\mu$ molのMnCl<sub>2</sub>、0.1  $\mu$ molのAMP、1.0  $\mu$ molのNaF、25nmolのオリゴ糖、50pmolの<sup>35</sup>S-PAPS(約5.0 $\times 10^5$ cpm)及び5  $\mu$ Lの抽出物を含む50  $\mu$ Lの溶液を反応混合液とした。この反応混合液を30℃で5時間インキュベートし、反応チューブを沸騰水中に1分間浸すことによって反応を停止させた。<sup>35</sup>S-ラベルされたオリゴ糖を、Superdex 30 ゲルクロマトグラフィーによって<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>及び<sup>35</sup>S-PAPSから分離し、放射活性を測定した。GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcを受容体として用いた場合、硫酸基転移反応は分析条件下において5時間まで直線的に進行した。

【0111】(7) Superdex 30 クロマトグラフィー、濾紙電気泳動、濾紙クロマトグラフィー、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)及びTLC(薄層クロマトグラフィー)

Hiload Superdex 30 16/60カラムを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>で平衡化した。流速は1mL/分で行った。1mLの画分を集め、4mLのクリアソル(Clearsol; ナカライテスク(Nakarai Tesque)社)と混合し、放射活性を測定した。オリゴ糖は210nmの吸光度でモニターした。濾紙電気泳動は、ワットマン(Whatman) No.3濾紙(2.5cm x 57cm)を用い、ピリジン/酢酸/水(体積比1:10:400, pH4)中、30V/cmで40分間行なった。濾紙クロマトグラフィー用のサンプルは、Whatman No.3濾紙(2.5cm x 57cm)にスポットし、1-ブタノール/酢酸/1M NH<sub>4</sub>OH(体積比3:2:1)で展開した。濾紙電気泳動または濾紙クロマトグラフィー後、濾紙を乾燥させ、この濾紙を1.25cmの薄片に切り、放射活性を液体シンチレーションカウンティングにより測定した。

【0112】<sup>35</sup>S-ラベルされた硫酸化GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcから得られた<sup>35</sup>S-ラベルされた産物のHPLC分析は、5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>で平衡化されたPartisil SAX-10カラム(4.5mm x 25cm)で行った。このカラムを5mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>で展開した。なお流速は1mL/分、カラム温度は40℃で行った。0.5mLづつ画分を採取し、4mLのクリアソルと混合し、放射活性を測定した。TLCは、0.1mm厚のセルロースでコートされたアルミニウムシート(メルク(Merck)社)を用い、エチルアセテート/ピリジン/テトラヒドロフラン/水/酢酸(体積比50:22:15:15:4)中で行なった(Biochem. J., 319, 209-216 (1996))。

【0113】(8) <sup>35</sup>S-ラベルされた硫酸化GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcのN-脱アセチル化、脱アミノ化及びN

aBH<sub>4</sub>還元

<sup>35</sup>S-ラベルされた硫酸化GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAcは、発現させた本発明ポリペプチド(抽出物中の蛋白量として2.1 μg)を用い、<sup>35</sup>S-PAPS量を6倍増やし、インキュベーション時間を25時間にする以外は前記と同様の方法で製造した。Superdex 30カラムから溶出された<sup>35</sup>S-ラベルされた硫酸化GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAcは、凍結乾燥し、濾紙電気泳動で精製し、1.0%ヒドラジン硫酸を含む70%ヒドラジン中で95℃、6時間脱アセチル化した(Anal. Biochem. 176, 96-104(1989))。脱アセチル化した物質はSuperdex 30クロマトグラフィーにより精製し、亜硝酸(pH4)中で脱アミノ化し、NaBH<sub>4</sub>中で還元した(Biochem. J. 235, 225-236(1986))。最終的に、サンプルを60 μLの水に溶解し、濾紙クロマトグラフィーに付した。

#### 【0114】(9) 免疫学的手法

6-硫酸化ルイスX (6-sulfo Lewis X; Gal β 1-4(Fuc α 1-3)(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc)に反応するマウスIgMモノクローナル抗体(AG223)を産生するハイブリドーマセルライン AG223は、KohlerとMilsteinの方法(Nature 256, 495-497(1975))により作製し、抗糖鎖抗体の産生に用いた(Kannagi, R., and Hakomori, S. (1986) in Handbook of Experimental Immunology, Vol. 4, Applications of immunological methods in biomedical sciences (Weir, D. M., Herzenberg, L., Blackwell, C., and Herzenberg, L. A., eds) pp. 117. 1-117. 20, Blackwell Scientific Pub. Inc., Boston)。6-硫酸化ルイスXセラミド(Gal β 1-4(Fuc α 1-3)(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer)をSalmonella minnesota R595株に吸着させ、BALB/cマウスの腹腔内免疫に用いた。免疫は、0日目(5 μg糖脂質)、3日目(10 μg)、7日目(15 μg)、12日目(20 μg)、17日目(25 μg)及び31日目(35 μg)と、繰り返して行った。最終免疫から3日後、脾臓細胞を採取し、マウスミエローマ P3/X63-Ag8U1と融合させた。同じ糖脂質を、クローニングの際に行うハイブリドーマ培養上清のELISAの抗原として用いた。ELISAは、96ウェルの培養プレートの底に固相化した糖脂質抗原を用い、標準的な方法(Hakomori, S., and Kannagi, R. (1986) in Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, Immunochemistry (Weir, D. M., Herzenberg, L., Blackwell, C., and Herzenberg, L. A., eds) pp. 9. 1-9. 39, Blackwell Scientific Pub. Inc., Boston)で行った。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgM(μ鎖特異的、カペル社(Cappel Inc.))を二次抗体として用いた。

【0115】6-硫酸化シアリルN-アセチルラクトサミン(NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc)構造に反応するマウスIgMモノクローナル抗体(G72)を産生するハイブリドーマセルライン G72は、6-硫酸化シアリルルイスXセラミドを用いて同様に作製した。

【0116】6-硫酸化シアリルルイスXセラミドに反応

するが、6'-硫酸化シアリルルイスXセラミド、6,6'-bis-硫酸化シアリルルイスXセラミド、6-硫酸化ルイスXセラミド、ルイスXセラミド等には反応しない(従って、6-硫酸化シアリルルイスX抗原を認識する)マウスIgMモノクローナル抗体(G152)は、6-硫酸化シアリルルイスXセラミドを抗原として、J. Biol. Chem., 273, 11225-11233(1998)に記載の方法で作製した。

【0117】CSLEX-1モノクローナル抗体(Cancer Res., 44, 5279-5285(1984); シアリルルイスX抗原に反応する)は、シアリルルイスX抗原を検出するために用いた。抗原エピトープの細胞表面上での発現は、FACSscan(ベクトン・ディッキンソン(Becton Dickinson)社)を用いたFACS (Biochem. Biophys. Res. Commun., 230, 546-551(1997))で解析した。

【0118】(10) ノーザン及びゲノムサザンプロット解析

(10-1) マウス

C57 BL/6Jマウスの組織から、Anal. Biochem., 162, 156-159(1987)に記載の方法で全RNA(20 μg)を調製した。マウスD3胚性幹細胞から調製したゲノムDNA(10 μg)(J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27-45(1985))を適当な制限酵素で4時間消化した。放射性プローブは、マウス7日胚cDNAライブラリーのスクリーニングに用いたものと同じものを用いた。プロットは、55℃条件下で2xSSPE(塩化ナトリウム/リン酸ナトリウム/EDTA緩衝液)、0.1% SDS中で、最終的には0.1xSSPE、0.1%SDS中で55℃条件下で洗浄した。メンブランはBAS-イメージングプレート(BAS-imaging plate)に露光し、メンブラン上の放射活性をBAS 2000ラジオイメージアナライザー(富士写真フィルム)で測定した。

【0119】(10-2) ヒト

ヒトの組織から、上記(10-1)と同様の方法で全RNAを調製した。ヒト由来の本発明DNAのBpu1102 I-BamH I 368bpフラグメント(配列番号3における塩基番号910-1277)をプローブとして用いた。プロットは、上記(10-1)と同様に行った。

【0120】(11) In situ ハイブリダイゼーション

C57 BL/6Jマウスから作製した標本を、ヘマトキシリン-エオシン染色又は insitu ハイブリダイゼーションに付した。本発明ポリペプチドのプローブとして、cDNAの0.6kbp Pst Iフラグメント(配列番号1における塩基番号962-1561)を pBluescript II SK-にサブクローニングした。センス及びアンチセンス cRNAプローブは、DIG RNAラベリングキット(ペーリンガー・マンハイム(Boehringer Mannheim))を用いたin vitro転写により調製した。

【0121】(12) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション分析

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(fluorescence i

n situ hybridization (FISH) 分析は、ヒト由来の本発明 DNA (配列番号 3 における塩基番号 1 ~ 2 4 0 9) をプローブとして用いて、Genomics, 17, 514-515 (1993) に記載の方法に従って行った。

#### 【0122】<2>結果

##### (1) 本発明 DNA のクローニング

マウスのコンドロイチン 6-スルホトランスフェラーゼが既にクローニングされており、ESTデータベースによる探索の結果、マウスのコンドロイチン 6-スルホトランスフェラーゼの触媒部位に相同性を有する短い配列 (Genbank accession 番号: AA103962) が見つかった。相当する cDNA フラグメントを RT-PCR で得た (配列番号 1 における塩基番号 1139-1506)。この cDNA フラグメントをプローブとして、約  $8 \times 10^5$  プラークのマウス 7 日胚 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、6 つの独立のクローンを得た。最も長い cDNA インサート (2.2 kb) の塩基配列を決定した (配列番号 1)。決定された 2150 bp の cDNA は、483 アミノ酸残基 (分子量: 52829 ダルトン (Da)、N-結合グリコシレーションが可能な部位 (potential N-linked glycosylation sites) を 4 つ有している) からなる単一のオープンリーディングフレームを含んでいた (配列番号 1)。最初の ATG コドンの周辺の配列は Kozak のルール (Cell, 44, 283-292 (1986)) に適合しており、上流領域はインフレーム停止コドン (in-frame stop codon) を含んでいた。ヒドロパシープロット分析により、アミノ末端側に 20 残基 (8 番目の Ala ~ 27 番目の Leu) からなる 1 つの顕著な疎水性領域が存在することが示され、このことから本発明ポリペプチドは II 型膜貫通タンパク質であることが示唆された (図 1)。本発明ポリペプチドは、マウスのコンドロイチン 6-スルホトランスフェラーゼ及びヒトのセラタン硫酸 Gal-6-スルホトランスフェラーゼ (J. Biol. Chem., 272, 32321-32328 (1997)) に対し、それぞれ 25% 及び 27% の相同性を有していた。しかしながら、このタンパク質のアミノ酸配列と他の公知のスルホトランスフェラーゼ (J. Biol. Chem., 267, 15744-15750 (1992)、J. Biol. Chem., 272, 13980-13985 (1997)、J. Biol. Chem., 272, 28008-28019 (1997)、J. Biol. Chem., 272, 29942-29946 (1997)、J. Biol. Chem., 272, 4864-4868 (1997)) のアミノ酸配列との間に有意な相同性は見られなかった。

【0123】また配列番号 1 で示される DNA を用いてヒト胎児脳 cDNA を保持する  $\lambda$  gt11 ライブラリーをスクリーニングすることによって、ヒト由来の本発明 DNA を得た (配列番号 3)。得られた DNA は 2409 bp からな

り、484 アミノ酸残基からなる単一のオープンリーディングフレームを含んでいた (配列番号 3)。ヒドロパシープロット分析により、このポリペプチドは、アミノ末端側に膜貫通ドメインを有する II 型膜貫通タンパク質であることが示唆された。

【0124】最初の ATG コドンの周辺の配列は Kozak のルール (Cell, 44, 283-292 (1986)) に適合していた。なお最初の ATG コドンの 41 塩基上流に他の ATG コドンが存在している。この ATG コドンの周辺も Kozak のルールに適合しており、この ATG コドンはマウス由来の本発明 DNA の対応する部分にも存在している。ヒト由来、マウス由来のいずれにおいても、最初の ATG コドンとこの ATG コドンの間に終止コドンは存在していない。従って本発明 DNA においては上記 2 箇所の ATG コドンのいずれもが開始コドンとして機能しうると考えられる。

【0125】配列番号 1 の DNA によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 2 に、配列番号 3 の DNA によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 4 にそれぞれ示す。配列番号 2 及び配列番号 4 の間の相同性は 85% 以上であった。

##### 【0126】(2) 本発明 DNA から本発明ポリペプチドの発現

5'-及び 3'-の非コード領域を除去した本発明 DNA (配列番号 1 における塩基番号 467-1921) を哺乳類発現ベクター pcDNA3 に挿入し、COS-7 細胞中で過剰発現させた。<sup>35</sup>S-ラベルした PAPS を硫酸基供与体、種々の複合糖質を硫酸基受容体として用い、トランスフェクトされた細胞の抽出物の硫酸基転移活性を調べた結果、コンドロイチン、コンドロイチン 4-硫酸、コンドロイチン 6-硫酸、デルマタン硫酸、セラタン硫酸、脱硫酸化セラタン硫酸、CD SNS-ヘパリン、ブタ胃由来ムチン及びウシ顎下腺由来ムチンには硫酸基が転移されなかった。

【0127】GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc を硫酸基受容体として実験した。反応混合物の Superdex 30 クロマトグラフィーの結果、正しい方向の cDNA (センス cDNA) が挿入されたベクター (pcDNA3-GlcNAc6ST) でトランスフェクトした細胞では受容体よりもわずかに高い放射性ピークが示され、受容体が硫酸化されていることが示された (図 2A)。トランスフェクトしなかった細胞や、逆方向の cDNA (アンチセンス cDNA) が挿入されたベクター (pcDNA3-GlcNAc6STA) でトランスフェクトした細胞では、硫酸基転移活性は非常に低かった (表 1)。

##### 【0128】

【表 1】

ベクター	硫酸基転移活性 (pmole/時間/mg タンパク質)
なし (トランスフェクトせず)	1.1 ± 0.7
センス cDNA	10.6 ± 2.4
アンチセンス cDNA	1.8 ± 0.9

(Superdex 30クロマトグラフィー(図2A)の画分番号85-89の放射活性から算出。受容体存在下での測定値から受容体非存在下での測定値を差し引いた値を示す。3回実験したS.D.も併せて示した)

【0129】これに対し、Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcは受容体とはならなかった(図2B)。このことから本発明ポリペプチドは、GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcには硫酸基を転移するが、Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcには硫酸基を転移しないことが確認された。

【0130】また、5'-及び3'-の非コード領域を除去した本発明DNA(配列番号3における塩基番号387-1844)を上記と同様にCOS-7細胞にトランスフェクトし、この細

胞の抽出物の硫酸基転移活性(硫酸基受容体として、GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcを用いた)を上記と同様に調べた。その結果、正しい方向のcDNA(センスcDNA)が挿入されたベクター(pcDNA3-hGlcNAc6ST)でトランスフェクトした細胞は、トランスフェクトしなかった細胞や、逆方向のcDNA(アンチセンスcDNA)が挿入されたベクター(pcDNA3-hGlcNAc6STA)でトランスフェクトした細胞に比べて5倍以上硫酸基転移活性が高かった(表2)。

【0131】

【表2】

ベクター	硫酸基転移活性(pmole/時間/mgタンパク質)
なし(トランスフェクトせず)	1.33 ± 0.62
センスcDNA	6.67 ± 0.51
アンチセンスcDNA	1.29 ± 0.23

(Superdex 30クロマトグラフィー画分の放射活性から算出。受容体存在下での測定値から受容体非存在下での測定値を差し引いた値を示す。3回実験したS.D.も併せて示した)

【0132】(3)本発明ポリペプチドにより硫酸基が転移される位置の決定(本発明ポリペプチド活性の測定方法)

GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcに転移された $^{35}\text{S}$ の位置を決定するため、放射活性産物をN-脱アセチル化、脱アミノ化及び $\text{NaBH}_4$ 還元の際に処理して分解した。分解後、濾紙クロマトグラフィーにより2つの放射活性産物が検出された(図3A)。早く移動するピークは( $\text{SO}_4$ -6)2,5-アンヒドロマンニトールの位置に移動した。 $^{35}\text{S}$ ラベルされたGlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcを長時間ヒドラジン分解処理すると遅く移動するピークが減少することから、遅く移動するピークは不完全な脱アセチル化による非分解産物であると考えられる。早く移動するピークをHPLCにより解析した結果、 $^{35}\text{S}$ -放射活性は( $\text{SO}_4$ -6) $^3\text{H}$ -2,5-アンヒドロマンニトールと共に溶出された(図3B)。 $^{35}\text{S}$ -及び $^3\text{H}$ -放射活性は、6-硫酸化2,5-アンヒドロマンニトールを4-硫酸化又は3-硫酸化2,5-アンヒドロマンニトールから分離できる溶媒系(Biochem. J., 319, 209-216(1996))を用いたTLC上でも共に移動した。これらの結果から、 $^{35}\text{S}$ は、GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcの非還元末端のGlcNAcの6位に転移することが示された。従ってクローニングされた本発明DNAは本発明ポリペプチドをコードしていることが示された。

【0133】(4)本発明DNAの細胞内への移入による、硫酸化糖の発現  
マウス由来の本発明DNAでトランスフェクトしたCOS-7細胞

における、新しい抗原エピトープの発現を調べた。G72抗体を用いて硫酸化シアリル-N-アセチルラクトサミン構造の発現解析を行った。この抗体は6-硫酸化シアリルルイスXセラミド及びSL2L4に反応するが、6'-硫酸化シアリルルイスXセラミドやシアリルパラグロボシドには反応しない(図4)。このことは、この抗体の反応に必要な最小構造がNeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4( $\text{SO}_4$ -6)GlcNAcであることを示している。本発明DNAでトランスフェクトしたCOS-7細胞がG72抗原を発現することが示された(図5B)。トランスフェクトしていない細胞(図5A)及びアンチセンスcDNAでトランスフェクトした細胞(図5C)はこの抗体に反応しなかった。ノイラミニダーゼ処理すると抗原性は消失した(図5E)。これらの結果から、本発明ポリペプチドはNeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4( $\text{SO}_4$ -6)GlcNAc抗原の合成に関与していると結論された。

【0134】本発明ポリペプチドが6-硫酸化N-アセチルラクトサミン構造の形成に関与していることの証拠を更に得るため、COS-7細胞をマウス由来の本発明DNA及びフコシルトランスフェラーゼIVのcDNAで二重にトランスフェクトした。フコシルトランスフェラーゼIVは、フコースをN-アセチルラクトサミンに転移することによってルイスX構造(Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc)を形成できることが知られている(J. Biol. Chem., 266, 17467-17477(1991), Cell, 63, 1349-1356(1990))。トランスフェクションによる細胞表面の変化をモニターするために、6-硫酸化ルイスX(Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)( $\text{SO}_4$ -6)GlcNAc)構造に特異的に反応し、ルイスX(Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc)や6'-硫酸化ルイスX(( $\text{SO}_4$ -6)Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc)構造には反応しないモノクローナル抗体AG223を用いた(図4)。本発明DNA及びフコシルトランスフェラーゼのcD



NAでトランスフェクトした結果、細胞は6-硫酸化ルイスX抗原陽性となった(図6C)。しかしどちらか一方のcDNAだけでトランスフェクトした場合、細胞は6-硫酸化ルイスX抗原陽性にはならなかった(図6A、B)。フコシルトランスフェラーゼのcDNAだけでトランスフェクトした場合、細胞はルイスX抗原陽性となった(図6D)。

【0135】また、ヒト由来の本発明DNAでトランスフェクトしたCOS-7細胞における、新しい抗原エピトープの発現を調べた。CSLEX-1抗体(Cancer Res., 44, 5279-5285(1984);シアリルルイスX抗原に反応する)、G72抗体、およびG152抗体(6-硫酸化シアリルルイスXセラミドに反応するが、6'-bis-硫酸化シアリルルイスXセラミド、6-硫酸化ルイスXセラミド、ルイスXセラミド等には反応しない)を用いて、上記と同様に細胞表面上での硫酸化糖の発現解析を行った。結果を図7に示す。

【0136】その結果、トランスフェクトしなかった細胞はいずれの抗体にも反応しなかった。フコシルトランスフェラーゼのcDNAのみでトランスフェクトした細胞はCSLEX-1抗体のみに反応した。またヒト由来の本発明DNAのみでトランスフェクトした細胞はG72抗体のみに反応した。またヒト由来の本発明DNA及びフコシルトランスフェラーゼのcDNAでトランスフェクトした細胞はCSLEX-1抗体、G72抗体及びG152抗体のいずれにも反応した。

【0137】これらの結果から、本発明DNAを細胞に移入することによって6-硫酸化シアリル-N-アセチルラクタミン構造を有する硫酸化糖を製造することができ、また本発明DNA及びフコシルトランスフェラーゼのcDNAを共に細胞に移入することにより、6-硫酸化シアリルルイスX構造を有する硫酸化糖を製造することができることが示された。

【0138】(5) ノーザンプロット及びサザンプロット解析

成体マウスの組織(小脳、大脳、眼球、心臓、肺、筋肉、脾臓、胸腺、肝臓、膵臓、腎臓、胃、小腸、子宮、卵巣及び精巣)を用いて調べた結果、本発明ポリペプチドは大脳、小脳、目、肺及び膵臓で強く発現していた(図8A)。腸、子宮、卵巣、腸間膜リンパ節およびその周辺に中等度のシグナルが観察された(図8A)。主要な転写産物のサイズは3.9kbであった。サザンプロットにおいて、Eco RI、Rco RV又はSac Iによる消化産物が、いずれも単一のバンドでプローブに反応した。このことは本発明ポリペプチドの遺伝子は単一コピー遺伝子(single copy gene)であることを示している(図8B)。

【0139】またヒトの組織(心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、末梢血リンパ球、胃、甲状腺、脊髄、リンパ節、気管、副腎、骨髄)を用いて調べた結果、本発明ポリペプチドは骨髄、末梢血リンパ球、脾臓、脳、脊髄、卵巣及び胎盤で強く発現していた。リン

パ節、胸腺、心臓、肺、気管、胃、小腸、結腸、甲状腺、前立腺及び副腎に中程度のシグナルが観察された。主要な転写産物のサイズは3.6kbであった。

【0140】(6) In situハイブリダイゼーション分析

本発明ポリペプチドの発現部位を決定するためにIn situハイブリダイゼーションを行った。成体マウスの脳においては、海馬のCA3野の錐状体細胞、小脳核及びプルキンエ細胞で強いシグナルが検出された。CA1野を含む海馬の他の部分、視床、橋核、嗅結節、嗅球で中等度のシグナルが検出された。

【0141】リンパ系組織内での本発明DNAの転写産物の局在を、腸間膜リンパ節を用いて調べた。HEV(高内皮細静脈; high endothelial venules; L-セレクトインのリガンドが局在している(J. Cell Biol., 113, 1213-1221(1991)))が傍皮質中に存在していた。HEVは、長円形の大きな核と少量の細胞質とからなる立方内皮である。本発明ポリペプチドのシグナルは、これら内皮に特異的に発現していた。

【0142】(7) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション分析

ヒト由来の本発明DNAの染色体上での位置を決定するため、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション分析を行った。その結果、ヒト由来の本発明DNAは染色体7 q 31部位に存在することが示された。

【0143】(8) 図面の説明

図1 マウス由来の本発明ポリペプチドのヒドロパシープロット。ヒドロパシープロットは、Kyte 及び Doolittle(J. Mol. Biol., 157, 105-132(1982))の方法で、11アミノ酸のウインドウで算出した。

【0144】図2 マウス由来の本発明ポリペプチドの基質特異性。A: GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcを硫酸基受容体として用いた場合。B: Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc(LiLi)を硫酸基受容体として用いた場合。酵素反応後、生成物をSuperdex 30ゲルクロマトグラフィーで分析した。○は受容体存在下、○は受容体非存在下での結果を示す。矢印は受容体の溶出位置を示す。

【0145】図3 A:  $^{35}\text{S}$ ラベルされたGlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcをN-脱アセチル化、脱アミノ化分解及び還元し、濾紙クロマトグラフィーで分離した。矢印1、2及び3は標準物質の移動位置を示す。1は( $\text{SO}_4$ -6)Gal  $\beta$ 1-4( $\text{SO}_4$ -6)2,5-アンヒドロマンニトールを、2はGal  $\beta$ 1-4( $\text{SO}_4$ -6)2,5-アンヒドロマンニトールを、3は( $\text{SO}_4$ -6)2,5-アンヒドロマンニトールを示す。B: A中の横棒で示した画分( $^{35}\text{S}$ ラベルされた( $\text{SO}_4$ -6)2,5-アンヒドロマンニトール画分)を $^3\text{H}$ -ラベルされた( $\text{SO}_4$ -6)2,5-アンヒドロマンニトール(標準品)と混合し、SAX-10カラムを用いたHPLCで分析した。それぞれの画分の $^3\text{H}$ 放射活性(○)及び $^{35}\text{S}$ 放射活性(○)を測定した。

【0146】図4 ELISAによるAG223及びG72モノクロ

ーナル抗体の特異性の解析。糖脂質を96ウェルの培養プレート底面に固相化し、ELISA解析を行った。SはNeuAcを、LexはルイスXセラミドを、PGはパラグロポシドを、SL2L4はNeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc  $\beta$ 1-3(SO<sub>4</sub>-6)Gal  $\beta$ 1-4(SO<sub>4</sub>-6)GlcNAc-コレステリルアニリン(cholesteryl aniline)を示す。

【0147】図5 マウス由来の本発明DNAのトランスフェクションによるG72抗原の発現。トランスフェクション前のCOS-7細胞(A及びD)、センス(正しい方向の)cDNAでトランスフェクトした細胞(B及びE)又はアンチセンス(逆方向の)cDNAでトランスフェクトした細胞(C及びF)を、G72モノクローナル抗体と反応させ、FACSで解析した。太線は抗体と反応後のパターンを、細線は抗体と反応前のパターンを示す。-NANaseはノイラミニダーゼ消化前、+NANaseは0.02ユニット/mL PBS (pH7.4)の Arthrobacter ureafaciens由来ノイラミニダーゼで37℃下、30分間消化後の結果を示す。

【0148】図6 マウス由来の本発明DNAとフコシルトランスフェラーゼIV cDNAとのダブルトランスフェクションによるAG223抗原(6-硫酸化ルイスX)の発現。フコシルトランスフェラーゼ cDNAのみでトランスフェクトしたCOS-7細胞(A及びD)、本発明DNAのみでトランスフェクトしたCOS-7細胞(B及びE)、両方のDNAでトランスフェクトしたCOS-7細胞(C及びF)を、AG223モノクローナル抗体と反応させ(A-C)、又はLeuM1(抗ルイスX抗体)と反応させ(D-F)、FACSで解析した。太線は抗体と反応後のパターンを、細線は抗体と反応前のパターンを示す。

【0149】図7 ヒト由来の本発明DNAのトランスフェクションによるG72抗原(6-硫酸化シアリル-N-アセチ

ルラクタミン抗原)の発現、並びにヒト由来の本発明DNAとフコシルトランスフェラーゼIV cDNAとのダブルトランスフェクションによるG152抗原(6-硫酸化シアリルルイスX抗原)の発現。データは、トランスフェクトされた細胞における抗原陽性群の平均蛍光強度である。

【0150】図8 マウス由来の本発明ポリペプチドのノーザン及びサザンプロット解析。A:ノーザンプロット解析。矢印は、13.5、9.8及び3.9kbの異なるmRNAを示す。リボソームRNAの位置は左側に示した。グリセロールデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼプローブとのハイブリダイゼーションでは、脾臓のバンド強度が弱かった以外は、それぞれのレーンで同程度のバンド強度を呈した。B:ゲノムサザンプロット解析。EcoRI、EcoRV又はSacIによる消化後、単一バンドが検出された。

【0151】

【発明の効果】本発明ポリペプチドは、N-アセチルグルコサミン-6-O-硫酸基転移酵素のポリペプチドであり、糖鎖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基の6位水酸基に特異的に硫酸基を転移する作用を有するので、GlyCAM-1(抗炎症剤等への利用が期待されている)等の機能性糖鎖の合成に有用である。また本発明DNAは、本発明ポリペプチドの大量合成や生体(細胞)におけるGlyCAM-1等の機能性糖鎖の人工的発現等に用いることができる。本発明方法1および2は、GlyCAM-1等の機能性糖鎖またはその合成中間体の製造方法として有用である。

【0152】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2150

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: マウス

組織の種類: 胚

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 470..1921

特徴を決定した方法: S

配列

GGCTAGGGCA GCGGAGTCTC GCGGCTCCCT CGAAGGCTTG GGGACCCCTA GCAGAAGAGA	60
ACCGGAGAGA AACCGAGGAG AGTGCTAGCC GGACAGTCCG CCGGTCCGGG ATCTGGGGAC	120
GCTCCGAGGC GCACCTCCG CTCCAGGTCC TTCTCGGAGC CGCTGCCATG GGAGAGCCAG	180
CCCTGGGCGC CGGGGACAG CAGCCTCTGC CGCCGCGGCC GCCTCGGATC GCGGGCCCCA	240
GTCCCGGCGC CCGCAGCCGG CCTGCAGCGT CCCCCTCCTG GGCTGCAGGG CCGCCTCCGC	300
CGCGCGCGCG GCCCGGCTG TGCCTGTGAT GAGCCGCAGC TCGCCGCGAG CTCTGCCCCC	360
CGGTGCGCTT CCCCAGCGCG TGCCGCGCGC GCCTGCGGCC GTGCAGCGGG CCCTGCTCCC	420

GCCGTGGCCC CGGCGGCAG GACGCGCTG GCCTGCGTCC CCGCTGGG ATG AAG	475
Met Lys	
1	
GTA TTT CGC AGG AAG GCG CTG GTG CTG TGC GCG GGC TAT GCA CTG CTA	523
Val Phe Arg Arg Lys Ala Leu Val Leu Cys Ala Gly Tyr Ala Leu Leu	
5 10 15	
CTG GTG CTC ACG ATG CTC AAC CTC TTG GAC TAC AAG TGG CAT AAA GAG	571
Leu Val Leu Thr Met Leu Asn Leu Leu Asp Tyr Lys Trp His Lys Glu	
20 25 30	
CCG CTG CAG CAG TGC AAC CCC GAC GGG CCT CTG GGT GCC GCG GTA GGG	619
Pro Leu Gln Gln Cys Asn Pro Asp Gly Pro Leu Gly Ala Ala Val Gly	
35 40 45 50	
GCG GCC GGG GCC GGC TGG GGA CGG CCG GGG TCG CCT CCT GCA GCG CCA	667
Ala Ala Gly Ala Gly Trp Gly Arg Pro Gly Ser Pro Pro Ala Ala Pro	
55 60 65	
CCC CGC GCT CAC TCT CGC ATG GAC CCC CGC ACC CCG TAC CGC CCT CCT	715
Pro Arg Ala His Ser Arg Met Asp Pro Arg Thr Pro Tyr Arg Pro Pro	
70 75 80	
GCC GCG GGC GTG GGG GCA GTT CCC GCA GCC GCG GCT GGG AGT GCA GGA	763
Ala Ala Gly Val Gly Ala Val Pro Ala Ala Ala Ala Gly Ser Ala Gly	
85 90 95	
GCT GCG GCC TCT CTG GGC AAT GCT ACT CGA GGC ACC AGG GGT GGA GGG	811
Ala Ala Ala Ser Leu Gly Asn Ala Thr Arg Gly Thr Arg Gly Gly Gly	
100 105 110	
GAC AAG CGG CAG TTG GTG TAT GTG TTC ACC ACG TGG CGC TCG GGC TCG	859
Asp Lys Arg Gln Leu Val Tyr Val Phe Thr Thr Trp Arg Ser Gly Ser	
115 120 125 130	
TCC TTC TTC GGT GAG CTC TTC AAC CAG AAC CCT GAG GTG TTC TTC CTC	907
Ser Phe Phe Gly Glu Leu Phe Asn Gln Asn Pro Glu Val Phe Phe Leu	
135 140 145	
TAT GAG CCT GTG TGG CAC GTG TGG CAA AAA CTG TAC CCC GGG GAC GCC	955
Tyr Glu Pro Val Trp His Val Trp Gln Lys Leu Tyr Pro Gly Asp Ala	
150 155 160	
GTT TCC CTG CAG GGG GCA GCG CGG GAC ATG CTG AGC GCT CTC TAC CGC	1003
Val Ser Leu Gln Gly Ala Ala Arg Asp Met Leu Ser Ala Leu Tyr Arg	
165 170 175	
TGC GAT CTT TCG GTT TTC CAG CTG TAT AGC CCC GCA GGC AGT GGG GGG	1051
Cys Asp Leu Ser Val Phe Gln Leu Tyr Ser Pro Ala Gly Ser Gly Gly	
180 185 190	
CGC AAC CTC ACC ACT CTG GGC ATC TTT GGG GCA GCC ACT AAC AAG GTG	1099
Arg Asn Leu Thr Thr Leu Gly Ile Phe Gly Ala Ala Thr Asn Lys Val	
195 200 205 210	
GTA TGC TCC TCG CCA CTC TGT CCT GCC TAC CGC AAG GAG GTC GTC GGA	1147
Val Cys Ser Ser Pro Leu Cys Pro Ala Tyr Arg Lys Glu Val Val Gly	
215 220 225	
CTG GTG GAC GAC CGC GTG TGC AAA AAG TGC CCA CCT CAA CGC CTG GCA	1195
Leu Val Asp Asp Arg Val Cys Lys Lys Cys Pro Pro Gln Arg Leu Ala	
230 235 240	
CGC TTC GAG GAG GAG TGT CGC AAG TAC CGC ACG GTG GTT ATC AAG GGC	1243
Arg Phe Glu Glu Glu Cys Arg Lys Tyr Arg Thr Val Val Ile Lys Gly	

245	250	255	
GTG CGG GTC TTC GAT GTG GCT GTG TTG GCG CCG CTG CTT AAA GAT CCA			1291
Val Arg Val Phe Asp Val Ala Val Leu Ala Pro Leu Leu Lys Asp Pro			
260	265	270	
GCC TTG GAC CTC AAG GTC ATC CAC CTA GTA CGT GAT CCT CGT GCT GTT			1339
Ala Leu Asp Leu Lys Val Ile His Leu Val Arg Asp Pro Arg Ala Val			
275	280	285	290
GCC AGC TCC CGC ATC CGC TCG CGT CAC GGC CTC ATC CGG GAA AGC CTA			1387
Ala Ser Ser Arg Ile Arg Ser Arg His Gly Leu Ile Arg Glu Ser Leu			
295	300	305	
CAG GTG GTG CGA AGC CGG GAT CCA AGA GCC CAC CGC ATG CCC TTC CTG			1435
Gln Val Val Arg Ser Arg Asp Pro Arg Ala His Arg Met Pro Phe Leu			
310	315	320	
GAG GCT GCT GGC CAC AAG CTT GGT GCC AAG AAG GAG GGT ATG GGT GGC			1483
Glu Ala Ala Gly His Lys Leu Gly Ala Lys Lys Glu Gly Met Gly Gly			
325	330	335	
CCA GCA GAC TAC CAC GCT CTG GGT GCA ATG GAG GTC ATC TGC AAC AGT			1531
Pro Ala Asp Tyr His Ala Leu Gly Ala Met Glu Val Ile Cys Asn Ser			
340	345	350	
ATG GCC AAG ACG CTG CAA ACA GCC CTG CAG CCT CCT GAC TGG CTG CAG			1579
Met Ala Lys Thr Leu Gln Thr Ala Leu Gln Pro Pro Asp Trp Leu Gln			
355	360	365	370
GGA CAC TAC TTG GTG GTG AGG TAC GAG GAT CTG GTG GGA GAC CCC GTT			1627
Gly His Tyr Leu Val Val Arg Tyr Glu Asp Leu Val Gly Asp Pro Val			
375	380	385	
AAG ACC CTA CGG AGG GTA TAT GAC TTT GTG GGG CTG CTG GTG AGT CCC			1675
Lys Thr Leu Arg Arg Val Tyr Asp Phe Val Gly Leu Leu Val Ser Pro			
390	395	400	
GAA ATG GAG CAG TTT GCC CTG AAC ATG ACC AGT GGT TCG GGC TCC TCC			1723
Glu Met Glu Gln Phe Ala Leu Asn Met Thr Ser Gly Ser Gly Ser Ser			
405	410	415	
TCC AAG CCT TTC GTG GTG TCA GCT CGC AAT GCC ACT CAG GCC GCC AAT			1771
Ser Lys Pro Phe Val Val Ser Ala Arg Asn Ala Thr Gln Ala Ala Asn			
420	425	430	
GCC TGG CGG ACC GCG CTC ACC TTC CAG CAG ATC AAA CAG GTG GAG GAG			1819
Ala Trp Arg Thr Ala Leu Thr Phe Gln Gln Ile Lys Gln Val Glu Glu			
435	440	445	450
TTT TGC TAC CAG CCC ATG GCC GTG CTG GGC TAT GAG CGG GTT AAC AGT			1867
Phe Cys Tyr Gln Pro Met Ala Val Leu Gly Tyr Glu Arg Val Asn Ser			
455	460	465	
CCT GAG GAG GTC AAA GAC CTC AGC AAG ACC TTG CTC AGG AAG CCC CGG			1915
Pro Glu Glu Val Lys Asp Leu Ser Lys Thr Leu Leu Arg Lys Pro Arg			
470	475	480	
CTT TGAGAAGGGT TCCAAGAGA TCTGACACTC TCCGGAGACA CCCACAAAAA			1968
Leu			
GGATGGTGTT GTGTTTAAAC AAACACAGCC CAGACCCAAG CTGAGGAAGC CCACATATTC			2028
TATTATAGAT ATATAATATA AATAACCACA CAGGCACTTG CTGTCAACGT TTTGAGTCAG			2088
TGCATTTCAG GGAACAGCCC TCAACTCACA CGACAACTT CTGGCCCTCC AACAAAGACAC			2148
AC			2150

[ 0 1 5 3 ]

配列番号 : 2

配列の長さ : 483

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met	Lys	Val	Phe	Arg	Arg	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala
1				5				10						15	
Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Thr	Met	Leu	Asn	Leu	Leu	Asp	Tyr	Lys	Trp	His
			20					25					30		
Lys	Glu	Pro	Leu	Gln	Gln	Cys	Asn	Pro	Asp	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	Ala
			35				40						45		
Val	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Trp	Gly	Arg	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Ala
	50					55				60					
Ala	Pro	Pro	Arg	Ala	His	Ser	Arg	Met	Asp	Pro	Arg	Thr	Pro	Tyr	Arg
65				70					75					80	
Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser
			85					90						95	
Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	Gly	Asn	Ala	Thr	Arg	Gly	Thr	Arg	Gly
			100					105						110	
Gly	Gly	Asp	Lys	Arg	Gln	Leu	Val	Tyr	Val	Phe	Thr	Thr	Trp	Arg	Ser
			115					120					125		
Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Gly	Glu	Leu	Phe	Asn	Gln	Asn	Pro	Glu	Val	Phe
	130				135				140						
Phe	Leu	Tyr	Glu	Pro	Val	Trp	His	Val	Trp	Gln	Lys	Leu	Tyr	Pro	Gly
145				150					155					160	
Asp	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Leu	Ser	Ala	Leu
			165						170					175	
Tyr	Arg	Cys	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser
			180						185					190	
Gly	Gly	Arg	Asn	Leu	Thr	Thr	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Ala	Ala	Thr	Asn
			195				200						205		
Lys	Val	Val	Cys	Ser	Ser	Pro	Leu	Cys	Pro	Ala	Tyr	Arg	Lys	Glu	Val
	210					215					220				
Val	Gly	Leu	Val	Asp	Asp	Arg	Val	Cys	Lys	Lys	Cys	Pro	Pro	Gln	Arg
225				230						235				240	
Leu	Ala	Arg	Phe	Glu	Glu	Cys	Arg	Lys	Tyr	Arg	Thr	Val	Val	Ile	
			245					250					255		
Lys	Gly	Val	Arg	Val	Phe	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	Leu	Leu	Lys
			260				265					270			
Asp	Pro	Ala	Leu	Asp	Leu	Lys	Val	Ile	His	Leu	Val	Arg	Asp	Pro	Arg
	275					280						285			
Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Arg	His	Gly	Leu	Ile	Arg	Glu
	290					295					300				
Ser	Leu	Gln	Val	Val	Arg	Ser	Arg	Asp	Pro	Arg	Ala	His	Arg	Met	Pro
305				310						315				320	
Phe	Leu	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Lys	Leu	Gly	Ala	Lys	Lys	Glu	Gly	Met
			325					330					335		
Gly	Gly	Pro	Ala	Asp	Tyr	His	Ala	Leu	Gly	Ala	Met	Glu	Val	Ile	Cys
			340					345					350		

Asn Ser Met Ala Lys Thr Leu Gln Thr Ala Leu Gln Pro Pro Asp Trp  
 355 360 365  
 Leu Gln Gly His Tyr Leu Val Val Arg Tyr Glu Asp Leu Val Gly Asp  
 370 375 380  
 Pro Val Lys Thr Leu Arg Arg Val Tyr Asp Phe Val Gly Leu Leu Val  
 385 390 395 400  
 Ser Pro Glu Met Glu Gln Phe Ala Leu Asn Met Thr Ser Gly Ser Gly  
 405 410 415  
 Ser Ser Ser Lys Pro Phe Val Val Ser Ala Arg Asn Ala Thr Gln Ala  
 420 425 430  
 Ala Asn Ala Trp Arg Thr Ala Leu Thr Phe Gln Gln Ile Lys Gln Val  
 435 440 445  
 Glu Glu Phe Cys Tyr Gln Pro Met Ala Val Leu Gly Tyr Glu Arg Val  
 450 455 460  
 Asn Ser Pro Glu Glu Val Lys Asp Leu Ser Lys Thr Leu Leu Arg Lys  
 465 470 475 480  
 Pro Arg Leu

【0154】

配列番号 : 3

配列の長さ : 2409

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ヒト

組織の種類 : 胎児脳

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 390..1844

特徴を決定した方法 : S

配列

CGAGGAACGA GTGACAGCCG GACAGTCCGC CGGGGGGTGA TCCGGGGCCG CTCCGGGGCG	60
CGCCCTCGGC TCCAGGTCCT ACCCGGAGCC GCTGCCATGG GAGAGCCAGC CTGGGGCGCT	120
GGGGACCAGC CGCCGCGCCC GCCTCGGAGT CGCGGCCCGA GTCCCGGGCGC CAGCAGCCAG	180
CCCGCTGCGT CCCCTTCCCG GGCTGCAGGG CTGCCTCCGC CGCGCCGCGC GCCCGGATTG	240
TGCTGTGAT GAGCCGCAGC CCGCAGCGAG CTCTGCCCCC GGGCGCGCTC CCTCGGCTGC	300
TCCAGGCTGC GCCTGCAGCG CAGCCGCGTG CCCTGCTCCC GCAGTGGCCC CGGCGCCCAG	360
GACGCGCGTG GCCCGCGTCC CCTCTCGGA ATG AAG GTG TTC CGT AGG AAG GCG	413
Met Lys Val Phe Arg Arg Lys Ala	
1 5	
CTG GTG TTG TGC GCG GGC TAT GCA CTG CTG CTG GTG CTC ACT ATG CTC	461
Leu Val Leu Cys Ala Gly Tyr Ala Leu Leu Leu Val Leu Thr Met Leu	
10 15 20	
AAC CTC CTG GAC TAC AAG TGG CAC AAG GAG CCG CTG CAG CAG TGC AAC	509
Asn Leu Leu Asp Tyr Lys Trp His Lys Glu Pro Leu Gln Gln Cys Asn	
25 30 35 40	
CCC GAT GGG CCG CTG GGT GCC GCA GCG GGG GCA GCC GGA GGC AAG CTG	557
Pro Asp Gly Pro Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Lys Leu	
45 50 55	

GGG GCG CCC AGG GCC GCC TCC GGC CGG GCC GCC CCG TGC TCA TGC CCG	605
Gly Ala Pro Arg Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ala Pro Cys Ser Cys Pro	
60 65 70	
TTT GGA CCT CCG CAC TCC TTA CCG CCC TCC CGC TGC CGC CGT CCG GGC	653
Phe Gly Pro Pro His Ser Leu Pro Pro Ser Arg Cys Arg Arg Arg Gly	
75 80 85	
GAT ACT CTG CAG CCG CGG CAG GGA TGG CGG GGG TTG CCG CCC CTC CAG	701
Asp Thr Leu Gln Pro Arg Gln Gly Trp Arg Gly Leu Arg Pro Leu Gln	
90 95 100	
GCA ATG GCA CTC GGG GCA CCG GAG GGC GTC GGG GAC AAG CCG CAC TGG	749
Ala Met Ala Leu Gly Ala Pro Glu Gly Val Gly Asp Lys Arg His Trp	
105 110 115 120	
ATG TAC GTG TTC ACC ACG TGG CGC TCT GGC TCG TCG TTC TTC GGC GAG	797
Met Tyr Val Phe Thr Thr Trp Arg Ser Gly Ser Ser Phe Phe Gly Glu	
125 130 135	
CTA TTC AAC CAG AAT CCC GAG GTG TTC TTT CTC TAC GAG CCA GTG TGG	845
Leu Phe Asn Gln Asn Pro Glu Val Phe Phe Leu Tyr Glu Pro Val Trp	
140 145 150	
CAT GTA TGG CAA AAA CTG TAT CCG GGG GAC GCC GTT TCC CTG CAG GGG	893
His Val Trp Gln Lys Leu Tyr Pro Gly Asp Ala Val Ser Leu Gln Gly	
155 160 165	
GCA GCG CGG GAC ATG CTG AGC GCT CTT TAC CGC TGC GAC CTC TCT GTC	941
Ala Ala Arg Asp Met Leu Ser Ala Leu Tyr Arg Cys Asp Leu Ser Val	
170 175 180	
TTC CAG TTG TAT AGC CCC GCG GGC AGC GGG GGG CGC AAC CTC ACC ACG	989
Phe Gln Leu Tyr Ser Pro Ala Gly Ser Gly Gly Arg Asn Leu Thr Thr	
185 190 195 200	
CTG GGC ATC TTC GGC GCA GCC ACC AAC AAG GTG GTG TGC TCG TCA CCA	1037
Leu Gly Ile Phe Gly Ala Ala Thr Asn Lys Val Val Cys Ser Ser Pro	
205 210 215	
CTC TGC CCC GCC TAC CGC AAG GAG GTC GTG GGG TTG GTG GAC GAC CGC	1085
Leu Cys Pro Ala Tyr Arg Lys Glu Val Val Gly Leu Val Asp Asp Arg	
220 225 230	
GTG TGC AAG AAG TGC CCG CCA CAG CGC CTG GCG CGT TTC GAG GAG GAG	1133
Val Cys Lys Lys Cys Pro Pro Gln Arg Leu Ala Arg Phe Glu Glu Glu	
235 240 245	
TGC CGC AAG TAC CGC ACA CTA GTC ATA AAG GGT GTG CGC GTC TTC GAC	1181
Cys Arg Lys Tyr Arg Thr Leu Val Ile Lys Gly Val Arg Val Phe Asp	
250 255 260	
GTG GCG GTC TTG GCG CCA CTG CTG CGA GAC CCG GCC CTG GAC CTC AAG	1229
Val Ala Val Leu Ala Pro Leu Leu Arg Asp Pro Ala Leu Asp Leu Lys	
265 270 275 280	
GTC ATC CAC TTG GTG CGT GAT CCC CGC GCG GTG GCG AGT TCA CCG ATC	1277
Val Ile His Leu Val Arg Asp Pro Arg Ala Val Ala Ser Ser Arg Ile	
285 290 295	
CGC TCG CGC CAC GGC CTC ATC CGT GAG AGC CTA CAG GTG GTG CGC AGC	1325
Arg Ser Arg His Gly Leu Ile Arg Glu Ser Leu Gln Val Val Arg Ser	
300 305 310	
CGA GAC CCG CGA GCT CAC CGC ATG CCC TTC TTG GAG GCC GCG GGC CAC	1373
Arg Asp Pro Arg Ala His Arg Met Pro Phe Leu Glu Ala Ala Gly His	



315	320	325	
AAG CTT GGC GCC AAG AAG GAG GGC GTG GGC GGC CCC GCA GAC TAC CAC			1421
Lys Leu Gly Ala Lys Lys Glu Gly Val Gly Gly Pro Ala Asp Tyr His			
330	335	340	
GCT CTG GGC GCT ATG GAG GTC ATC TGC AAT AGT ATG GCT AAG ACG CTG			1469
Ala Leu Gly Ala Met Glu Val Ile Cys Asn Ser Met Ala Lys Thr Leu			
345	350	355	360
CAG ACA GCC CTG CAG CCC CCT GAC TGG CTG CAG GGC CAC TAC CTG GTG			1517
Gln Thr Ala Leu Gln Pro Pro Asp Trp Leu Gln Gly His Tyr Leu Val			
365	370	375	
GTG CGG TAC GAG GAC CTG GTG GGA GAC CCC GTC AAG ACA CTA CGG AGA			1565
Val Arg Tyr Glu Asp Leu Val Gly Asp Pro Val Lys Thr Leu Arg Arg			
380	385	390	
GTG TAC GAT TTT GTG GGA CTG TTG GTG AGC CCC GAA ATG GAG CAG TTT			1613
Val Tyr Asp Phe Val Gly Leu Leu Val Ser Pro Glu Met Glu Gln Phe			
395	400	405	
GCC CTG AAC ATG ACC AGT GGC TCG GGC TCC TCC TCC AAG CCT TTC GTG			1661
Ala Leu Asn Met Thr Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ser Lys Pro Phe Val			
410	415	420	
GTA TCT GCA CGC AAT GCC ACG CAG GCC GCC AAT GCC TGG CGG ACC GCC			1709
Val Ser Ala Arg Asn Ala Thr Gln Ala Ala Asn Ala Trp Arg Thr Ala			
425	430	435	440
CTC ACC TTC CAG CAG ATC AAA CAG GTG GAG GAG TTT TGC TAC CAG CCC			1757
Leu Thr Phe Gln Gln Ile Lys Gln Val Glu Glu Phe Cys Tyr Gln Pro			
445	450	455	
ATG GCC GTC CTG GGC TAT GAG CGG GTC AAC AGC CCT GAG GAG GTC AAA			1805
Met Ala Val Leu Gly Tyr Glu Arg Val Asn Ser Pro Glu Glu Val Lys			
460	465	470	
GAC CTC AGC AAG ACC CTG CTT CGG AAG CCC CGT CTC TAAAAGGGT			1851
Asp Leu Ser Lys Thr Leu Leu Arg Lys Pro Arg Leu			
475	480		
TCCCAGGAGA CCTGATTCCC TGTGGTGATA CCTATAAAGA GGATCGTAGT GTGTTTAAAT			1911
AAACACAGTC CAGACTCAAA CGGAGGAAGC CCACATATTC TATTATAGAT ATATAAATAA			1971
TCACACACAC ACTTGCTGTC AATGTTTGA GTCAGTGCAT TTCAAGGAAC AGCCACAAAA			2031
TACACACCCC TAAGAAAAGG CAAGACTTGA ACGTTCTGAC CAGGTGCCCC TCTTCTTCTT			2091
TGCCCTTCTCT TGTCTCTTT CTCCTATTTC TTACCCGTGC CTCCACCTGC CTTCATTITT			2151
GAAGTGGGAT GTTAATGAAA TCAAGTTCCA GTAACCCAAA TCTTGTTTAC AAAATATTGC			2211
TGGTATCTGT GAACATGTTA AGAGTAATTT GGATGTGGGG GTGGGGGTGG AGAAAGGGGA			2271
AGTGGTCCAG AAACAAAAAG CCCCATTTGGG CATGATAAGC CGAGGAGGCA TTCTTCCTAA			2331
AAGTAGACTT TTGTGTAATA AGCAAAGGTT ACATGTGAGT ATTAATAAAG AAGATAATAA			2391
ATAAAAAAAA AAAAAAAA			2409

【0155】

配列番号：4

配列の長さ：484

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Lys Val Phe Arg Arg Lys Ala Leu Val Leu Cys Ala Gly Tyr Ala

1

5

10

15

Leu Leu Leu Val Leu Thr Met Leu Asn Leu Leu Asp Tyr Lys Trp His  
 20 25 30  
 Lys Glu Pro Leu Gln Gln Cys Asn Pro Asp Gly Pro Leu Gly Ala Ala  
 35 40 45  
 Ala Gly Ala Ala Gly Gly Lys Leu Gly Ala Pro Arg Ala Ala Ser Gly  
 50 55 60  
 Arg Ala Ala Pro Cys Ser Cys Pro Phe Gly Pro Pro His Ser Leu Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Arg Cys Arg Arg Arg Gly Asp Thr Leu Gln Pro Arg Gln Gly  
 85 90 95  
 Trp Arg Gly Leu Arg Pro Leu Gln Ala Met Ala Leu Gly Ala Pro Glu  
 100 105 110  
 Gly Val Gly Asp Lys Arg His Trp Met Tyr Val Phe Thr Thr Trp Arg  
 115 120 125  
 Ser Gly Ser Ser Phe Phe Gly Glu Leu Phe Asn Gln Asn Pro Glu Val  
 130 135 140  
 Phe Phe Leu Tyr Glu Pro Val Trp His Val Trp Gln Lys Leu Tyr Pro  
 145 150 155 160  
 Gly Asp Ala Val Ser Leu Gln Gly Ala Ala Arg Asp Met Leu Ser Ala  
 165 170 175  
 Leu Tyr Arg Cys Asp Leu Ser Val Phe Gln Leu Tyr Ser Pro Ala Gly  
 180 185 190  
 Ser Gly Gly Arg Asn Leu Thr Thr Leu Gly Ile Phe Gly Ala Ala Thr  
 195 200 205  
 Asn Lys Val Val Cys Ser Ser Pro Leu Cys Pro Ala Tyr Arg Lys Glu  
 210 215 220  
 Val Val Gly Leu Val Asp Asp Arg Val Cys Lys Lys Cys Pro Pro Gln  
 225 230 235 240  
 Arg Leu Ala Arg Phe Glu Glu Glu Cys Arg Lys Tyr Arg Thr Leu Val  
 245 250 255  
 Ile Lys Gly Val Arg Val Phe Asp Val Ala Val Leu Ala Pro Leu Leu  
 260 265 270  
 Arg Asp Pro Ala Leu Asp Leu Lys Val Ile His Leu Val Arg Asp Pro  
 275 280 285  
 Arg Ala Val Ala Ser Ser Arg Ile Arg Ser Arg His Gly Leu Ile Arg  
 290 295 300  
 Glu Ser Leu Gln Val Val Arg Ser Arg Asp Pro Arg Ala His Arg Met  
 305 310 315 320  
 Pro Phe Leu Glu Ala Ala Gly His Lys Leu Gly Ala Lys Lys Glu Gly  
 325 330 335  
 Val Gly Gly Pro Ala Asp Tyr His Ala Leu Gly Ala Met Glu Val Ile  
 340 345 350  
 Cys Asn Ser Met Ala Lys Thr Leu Gln Thr Ala Leu Gln Pro Pro Asp  
 355 360 365  
 Trp Leu Gln Gly His Tyr Leu Val Val Arg Tyr Glu Asp Leu Val Gly  
 370 375 380  
 Asp Pro Val Lys Thr Leu Arg Arg Val Tyr Asp Phe Val Gly Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Val Ser Pro Glu Met Glu Gln Phe Ala Leu Asn Met Thr Ser Gly Ser  
 405 410 415

Gly Ser Ser Ser Lys Pro Phe Val Val Ser Ala Arg Asn Ala Thr Gln  
420 425 430  
Ala Ala Asn Ala Trp Arg Thr Ala Leu Thr Phe Gln Gln Ile Lys Gln  
435 440 445  
Val Glu Glu Phe Cys Tyr Gln Pro Met Ala Val Leu Gly Tyr Glu Arg  
450 455 460  
Val Asn Ser Pro Glu Glu Val Lys Asp Leu Ser Lys Thr Leu Leu Arg  
465 470 475 480  
Lys Pro Arg Leu

【0156】

配列番号 : 5  
配列の長さ : 20  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
アンチセンス : NO  
配列

GTCGTCGGAC TGGTGGACGA

20

【0157】

配列番号 : 6  
配列の長さ : 20  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
アンチセンス : YES  
配列

CCCAGAGCGT GGTAGTCTGC

20

【0158】

配列番号 : 7  
配列の長さ : 29  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
アンチセンス : NO  
配列

ACGAATTCGG GATGAAGGTA TTTCGCAGG

29

【0159】

配列番号 : 8  
配列の長さ : 29  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
アンチセンス : YES  
配列

ATGAATTCTC AAAGCCGGGG CTTCCTGAG

29

【0160】

配列番号：9  
 配列の長さ：27  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸 合成DNA  
 アンチセンス：NO  
 配列  
 CTGAATTCGG AATGAAGGTG TTCCGTA

27

【0161】

配列番号：10  
 配列の長さ：27  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸 合成DNA  
 アンチセンス：YES  
 配列  
 GAGAATTCTT AGAGACGGGG CTCCGA

27

【図面の簡単な説明】

【図1】 マウス由来の本発明ポリペプチドのヒドロパシープロットを示す。

【図2】 マウス由来の本発明ポリペプチドの基質特異性を示す。

【図3】 マウス由来の本発明ポリペプチドによる硫酸基転移産物の解析結果を示す。

【図4】 ELISAによるAG223及びG72モノクローナル抗体の特異性の解析結果を示す。

【図5】 マウス由来の本発明DNAの移入（トランスフ

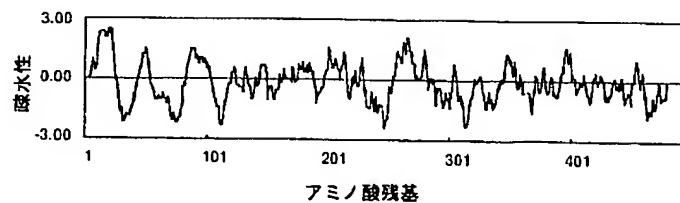
ェクション）によるG72抗原の発現を示す。

【図6】 マウス由来の本発明DNAとフコシルトランスフェラーゼIV cDNAとのダブルトランスフェクションによるAG223抗原(6-硫酸化レイスX)の発現を示す。

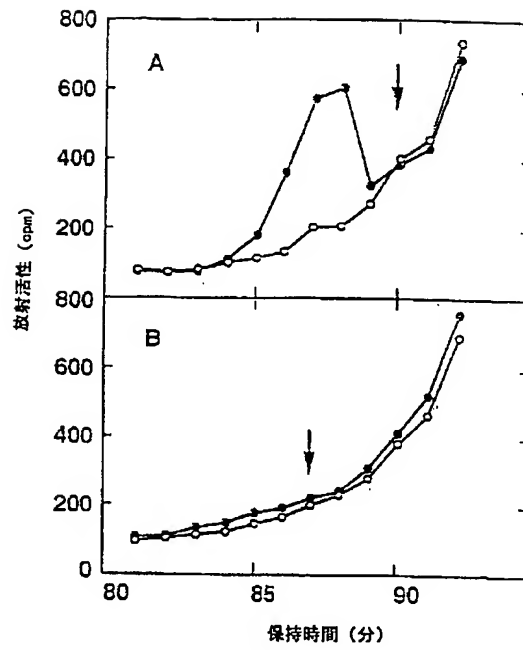
【図7】 ヒト由来の本発明DNAのトランスフェクションによるG72抗原の発現、並びにヒト由来の本発明DNAとフコシルトランスフェラーゼIV cDNAとのダブルトランスフェクションによるG152抗原の発現を示す。

【図8】 マウス由来の本発明ポリペプチドのノーザン及びサザンプロット解析結果を示す。

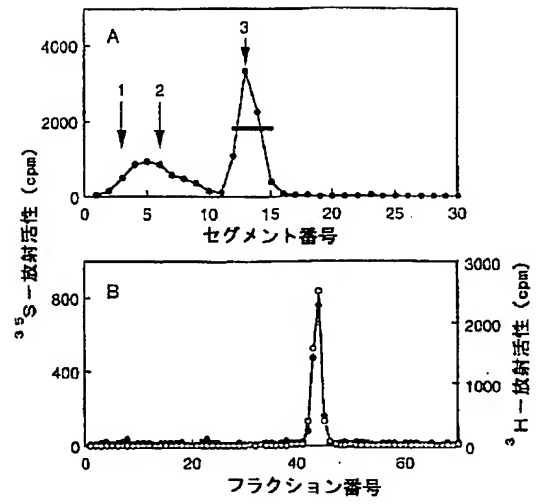
【図1】



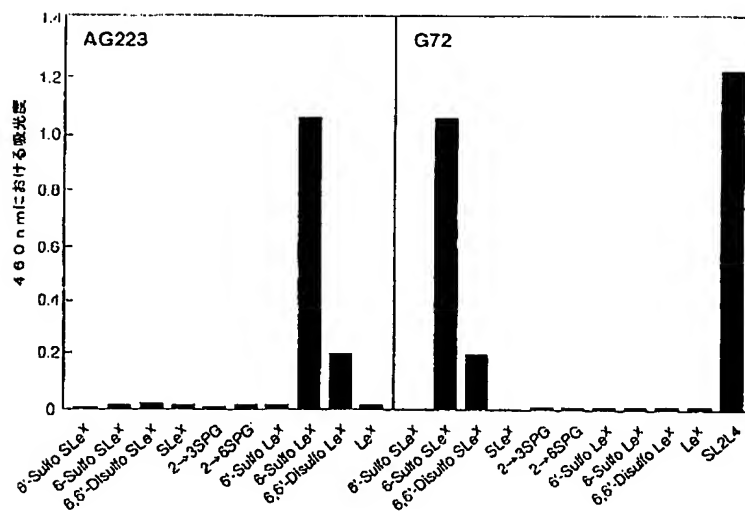
【図2】



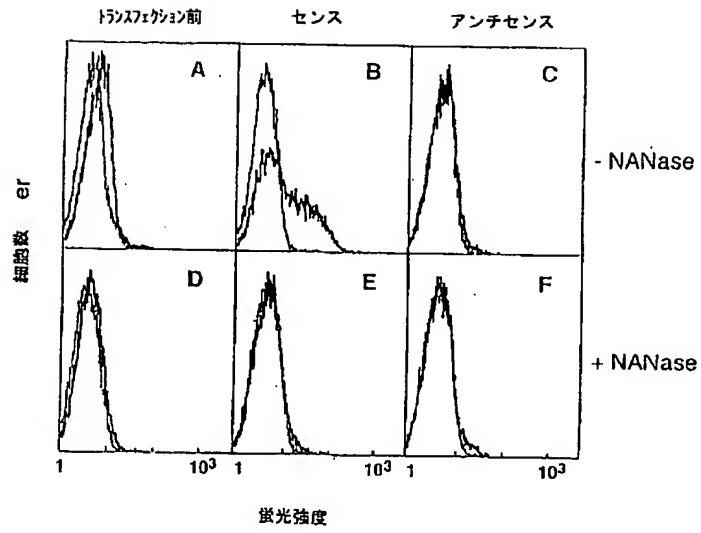
【図3】



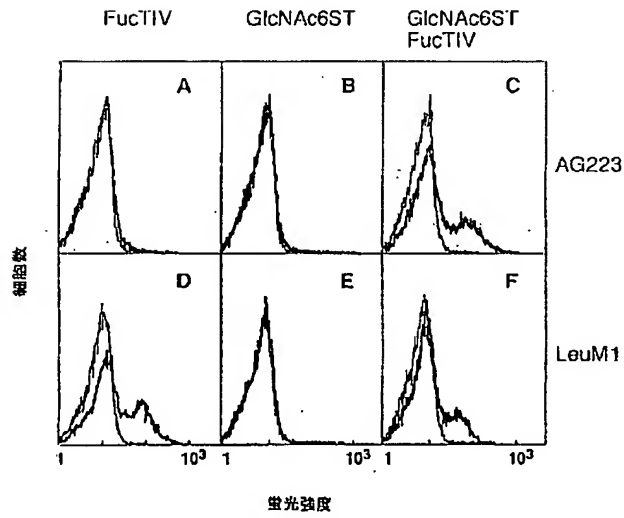
【図4】



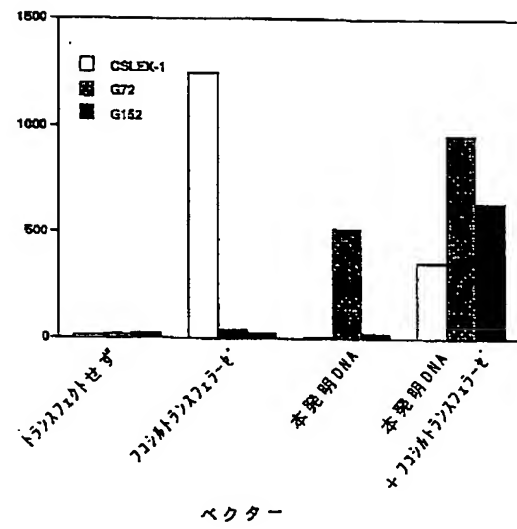
【図5】



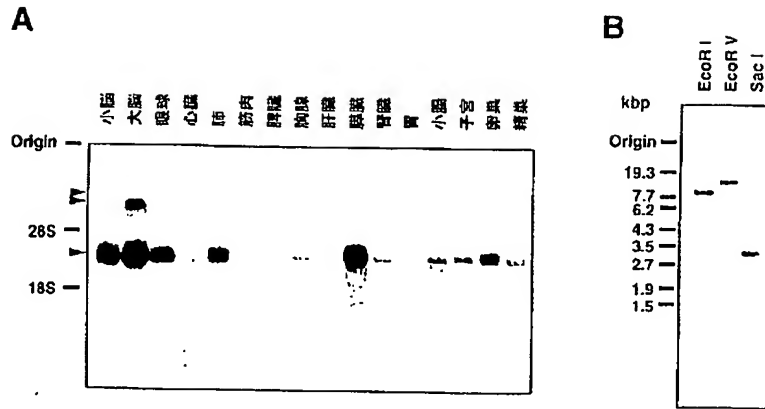
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 門松 健治  
愛知県名古屋市天白区中平五丁目1905番地  
ライオンズマンション中平101号  
(72)発明者 神奈木 玲児  
愛知県名古屋市千種区振甫町1-122 振  
甫町職員住宅B-10

(72)発明者 羽瀧 脩躬  
愛知県名古屋市昭和区八事富士見703番地  
(72)発明者 村松 喬  
愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒  
石2845の161